

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. med. Rita Engenhart-Cabillic
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg
GmbH, Standort Marburg und Gießen

**EXPRESSION HIF-1 ABHÄNGIGER GENE NACH
INHIBITION VON HIF-1 α MITTELS siRNA IN
HUMANEN LUNGENADENOKARZINOMZELLEN UND
DEREN REGULATION NACH PHOTONEN- UND
KOHLENSTOFFIONENBESTRAHLUNG**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Niklas Westholt

aus Köln

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 20.01.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Frau Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic

Korreferent: Herr PD Dr. M. Ritter

Vorwort

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation wurde im Zeitraum von August 2011 bis April 2013 an der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie (Direktorin: Frau Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic) der Philipps-Universität Marburg in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH Standort Gießen durchgeführt.

Die Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. med. vet. F. Subtil angefertigt und durch Frau Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic und Frau Dr. med. vet. F. Subtil betreut.

Die vorliegende Arbeit ist dem Gebiet der Onkologie der Lunge und der Strahlentherapie zuzuordnen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	- 1 -
1.1.	Epidemiologie der Bronchialkarzinome	- 1 -
1.2.	Tumor- & Strahlentherapie	- 2 -
1.2.1.	Photonenstrahlung	- 4 -
1.2.2.	Kohlenstoffionenstrahlung	- 5 -
1.3.1.	Hypoxie-induzierbarer-Faktor 1 (HIF-1).....	- 7 -
1.3.2.	HIF-1 abhängige Zielgene.....	- 11 -
1.4.	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	- 13 -
2.	Material und Methoden	- 14 -
2.1.	Materialien	- 14 -
2.1.1.	Geräte	- 14 -
2.1.2.	Verwendete PC-Programme	- 16 -
2.1.3.	Hilfs- & Verbrauchsmittel	- 16 -
2.1.4.	Lösungen & Kits	- 18 -
2.1.5.	Gebrauchslösungen	- 20 -
2.1.6.	siRNA-Sequenzen	- 21 -
2.1.7.	Antikörper	- 21 -
2.1.8.	Primer	- 22 -
2.2.	Zellkultur	- 23 -
2.2.1.	Zelllinien	- 23 -
2.2.2.	Zellkultivierung	- 23 -
2.2.3.	Zellzahlbestimmung	- 24 -
2.2.4.	Einfrieren und Auftauen der Zellen	- 24 -
2.2.5.	Versuchsablauf	- 25 -
2.2.6.	HIF-1 α Inhibition	- 26 -

2.2.7.	mTOR-Inhibition.....	- 27 -
2.2.8.	Sauerstoffbedingungen	- 27 -
2.2.9.	Bestrahlung	- 28 -
2.2.10.	Zellen stoppen	- 28 -
2.3.	Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	- 29 -
2.3.1.	RNA-Isolation	- 29 -
2.3.2.	RNA-Messung.....	- 30 -
2.3.3.	cDNA-Herstellung	- 30 -
2.3.4.	Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (q-PCR) .	- 30 -
2.3.5.	Primertest	- 31 -
2.3.6.	Auswertung.....	- 31 -
2.4.	Western Blot.....	- 31 -
2.4.1.	Protein-Isolation	- 32 -
2.4.2.	Proteinmessung	- 32 -
2.4.3.	Gelherstellung & Probenvorbereitung	- 33 -
2.4.4.	SDS-Gelelektrophorese.....	- 33 -
2.4.5.	Blotting.....	- 33 -
2.4.6.	Antikörperschritte.....	- 34 -
2.4.7.	Signaldetektion	- 34 -
2.4.8.	Membranstripping	- 35 -
2.4.9.	Densitometrie	- 35 -
2.5.	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	- 35 -
2.5.1.	Probenvorbereitung.....	- 35 -
2.5.2.	VEGF-Messung.....	- 36 -
2.5.3.	Auswertung.....	- 36 -

2.6.	MicroArray-Analyse	- 37 -
2.7.	Statistische Auswertung	- 37 -
3.	Ergebnisse	- 38 -
3.1.	HIF-1 α RNA-Ebene	- 38 -
3.2.	HIF-1 α Proteinebene	- 40 -
3.3.	HIF-1 α abhängige Zielgene (RNA-Ebene)	- 44 -
3.3.1.	Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A)	- 44 -
3.3.2.	Glukose-Transporter-1 (Glut-1)	- 48 -
3.3.3.	Lactatdehydrogenase-A (LDH-A)	- 51 -
3.3.4.	Pyruvatdehydrogenase-Kinase-1 (PDK-1)	- 54 -
3.3.5.	cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1-A = p21)	- 57 -
3.3.6.	Zusammenfassung	- 57 -
3.4.	HIF-1 α abhängige Zielgene (Proteinebene) - VEGF-A	- 60 -
3.5.	mTOR-Signalkaskade	- 63 -
3.5.1.	DNA-Microarray-Analyse	- 63 -
3.5.2.	Phosphoryliertes mTOR	- 65 -
3.5.3.	HIF-1 α	- 67 -
4.	Diskussion	- 69 -
4.1.	Photonenbestrahlung und HIF-1	- 69 -
4.1.1.	HIF-1 α Proteinexpression	- 70 -
4.1.2.	Expression der von HIF-1 abhängigen Zielgene	- 71 -
4.1.3.	PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade	- 73 -
4.2.	Inhibition von HIF-1	- 74 -
4.2.1.	siRNA-Transfektion	- 74 -
4.2.2.	Hemmung der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade	- 75 -
4.3.	Kohlenstoffionenstrahlung und HIF-1	- 76 -
4.3.1.	HIF-1 α Proteinexpression	- 77 -
4.3.2.	Expression der von HIF-1 abhängigen Zielgene	- 77 -

4.3.3.	PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade	- 78 -
4.4.	Photonen- vs. Kohlenstoffionenstrahlung.....	- 79 -
4.5.	Fazit und Ausblick	- 81 -
5.	Zusammenfassung	- 82 -
6.	Summary.....	- 84 -
Anhang		I
Abkürzungsverzeichnis		I
Tabellenverzeichnis		IV
Abbildungsverzeichnis		V
Literaturverzeichnis		VI
Tabellarischer Lebenslauf		Fehler! Textmarke nicht definiert.
Verzeichnis der akademischen Lehrer		XVI
Danksagung.....		XVII
Ehrenwörtliche Erklärung		Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie der Bronchialkarzinome

Bronchialkarzinome sind häufige und leider oft schlecht zu behandelnde Tumorerkrankungen. So waren 2008 in Deutschland 13.8% aller Tumoren bei Männern Bronchialkarzinome, damit waren sie nach Prostata- und Darmtumoren die dritthäufigste Tumorentität beim Mann. Auch bei Frauen ist die Lunge mit 7.0%, nach Mamma und Darm 2008 am dritthäufigsten durch Karzinome betroffen gewesen (Zentrum für Krebsregisterdaten). Wie schlecht die Diagnose Bronchialkarzinom wirklich ist, wird klar, wenn man die relative 5-Jahres-Überlebensrate betrachtet, die 2008 bei Frauen 19% und bei Männern sogar nur 15% betrug (Zentrum für Krebsregisterdaten). Damit waren in den vergangenen Jahren Bronchialkarzinome sogar die mit Abstand häufigste Krebstodesursache (Ahmedin Jemal 2010; Goeckenjan et al. 2010; Zentrum für Krebsregisterdaten).

Diese ungünstige Prognose lässt sich zum einen durch einen hohen Anteil an fortgeschrittenen Stadien (ca. 40% T4-Stadium) bei Erstdiagnose erklären (Hammerschmidt und Wirtz 2009; Zentrum für Krebsregisterdaten). Zum anderen ist die Therapie, trotz intensiver Forschung, bis heute oft nicht ausreichend. Jedoch gibt es neue Therapiemöglichkeiten, wie zum Beispiel die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen, die auf eine Verbesserung dieser Situation hoffen lassen (Sugane et al. 2009; Miyamoto et al. 2007b; Miyamoto et al. 2007a).

In der folgenden Arbeit werden Adenokarzinomzelllinien betrachtet, die zu den nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) zählen, welche mit ca. 30%, nach den Plattenepithelkarzinomen, einen Großteil aller Lungenkarzinome ausmachen (Pass 2010; Hammerschmidt und Wirtz 2009).

1.2. Tumor- & Strahlentherapie

In der Therapie der meisten Tumorleiden spielen chirurgische, pharmakologische und eben auch strahlentherapeutische Interventionen eine wichtige Rolle. Insgesamt werden ca. 50% aller Tumorkranken im Laufe ihrer Erkrankung strahlentherapiert (Seegenschmiedt et al. 2012; Delaney et al. 2005). Auch bei der Bekämpfung von Bronchialkarzinomen ist die Strahlentherapie, aufgrund früher Metastasierung, Resistenzentwicklung gegen Chemotherapeutika und dem häufig fortgeschrittenem Stadium bei Diagnosestellung, oft ein wichtiger Teil der Therapie (Anderson und Curran 2010; Hammerschmidt und Wirtz 2009).

Sobald die Indikation zur Strahlentherapie steht, ist „das Ziel jeder onkologischen Strahlenbehandlung [...] die Abtötung von Tumorzellen unter möglichst großer Schonung des Normalgewebes,“ (M. Bamberg, S. 237). Für den Therapieerfolg muss jede Tumorzelle in den *klonogenen Zelltod* übergehen, das bedeutet die unbegrenzte Teilungsfähigkeit verlieren, da es sonst zu Rezidiven kommt. Zum *klonogenen Zelltod* kann es über drei Mechanismen führen: den Interphasetod durch Apoptose, den Mitosetod und die Ausdifferenzierung (Abbildung 1) (M. Bamberg). Diese Effekte können *in vitro* mittels Koloniebildungstests und Zellüberlebenskurven quantifiziert (Herrmann et al. 2006) und in der Strahlentherapie durch ionisierende Strahlen erreicht werden.

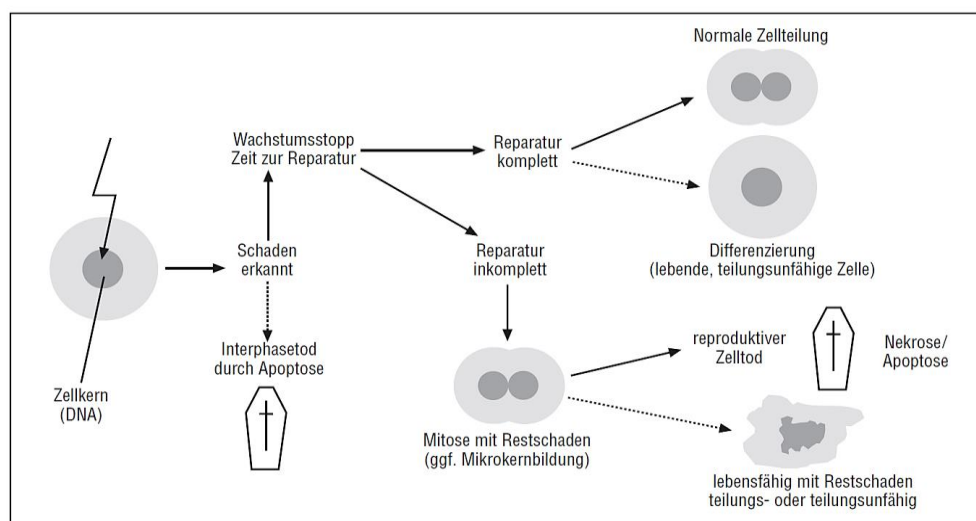


Abbildung 1: Klonogener Zelltod; schematische Darstellung aus: M. Bamberg

Diese ionisierenden Strahlen hinterlassen in dem durchdrungenem Gewebe Energie, die als Energiedosis bezeichnet und in Gray (Gy) angegeben wird ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$). Durch sie können Elektronen des Zieles auf ein höheres Energieniveau angehoben (Anregung) oder *direkt* Elektronen aus Molekülen herausgeschlagen (Ionisation) und so die Zelle bzw. die DNA geschädigt werden. Es können aber auch *indirekt* über verschiedene Wechselwirkungen geladene Teilchen erzeugt werden, welche wiederum die Zelle bzw. die DNA schädigen (Roots und Okada 1975; M. Bamberg). Um diese Schäden möglichst nur im Tumor auszulösen, wird die Therapie im Vorfeld akribisch geplant und der Patient punktgenau bestrahlt. Trotzdem kann gesundes Gewebe nie komplett ausgespart werden, sodass spätestens die unerwünschten Wirkungen der Strahlung die Dosis einschränken. Dies wird umgangen, indem fraktioniert, also verteilt auf viele kleinere Einzeldosen, bestrahlt wird. So können sich die Gewebe nach der Bestrahlung erholen und subletale Schäden wieder repariert werden (Reparatur) (Herrmann et al. 2006). Weiterhin sorgt diese Bestrahlungsart dafür, dass die Zellen sich zwischen den Fraktionen vermehren (Repopulierung), im Zellzyklus synchronisiert werden (Redistributierung) und sich die Versorgung mit Sauerstoff ehemals minderversorgter Zellen verbessert (Reoxygenierung). Während die Reparatur und die Repopulierung das bestrahlte Gewebe strahlenresistenter werden lassen (diese Mechanismen spielen vor allem im gesunden Gewebe eine Rolle), sorgen die Redistribution und die Reoxygenierung für eine erhöhte Strahlensensibilität des Tumors (M. Bamberg; Herrmann et al. 2006).

Anhand beider weiter oben genannten Ionisationsmechanismen lässt sich Strahlung also in *direkt ionisierende* (Elektronen, Protonen, Ionen; geladene Teilchen) und *indirekt ionisierende Strahlung* (Photonen, Neutronen; ungeladene Teilchen) einteilen. Für diese Arbeit wurden sowohl *indirekt ionisierende Photonen-* als auch *direkt ionisierende Kohlenstoffionenstrahlung* verwendet, welche deshalb in den folgenden Abschnitten näher vorgestellt werden.

1.2.1. Photonenstrahlung

Photonen zählen, wie oben erwähnt, zu den überwiegend *indirekt ionisierenden* Strahlungsarten. Es handelt es sich um den Überbegriff für Gamma- und Röntgenstrahlung. Heutzutage findet die Gammastrahlung nur noch selten Anwendung, da eine radioaktive Quelle benötigt wird. Röntgenstrahlen werden jedoch regelhaft für unterschiedliche Indikationen in der Klinik eingesetzt.

Eine entscheidende Eigenschaft der Photonen ist, dass sie einen relativ niedrigen linearen Energietransfer (LET) besitzen. Dieser LET ist "ein indirektes Maß für die Zahl der erzeugten geladenen Teilchen" (Herrmann et al. 2006, S. 6) im durchdrungenen Gewebe und wird anhand folgender Formel errechnet:

$$LET = \Delta E / \Delta s \text{ [keV}/\mu\text{m]}$$

(ΔE = mittlerer Energieverlust; Δs = zurückgelegte Wegstrecke)

Das bedeutet, dass Photonenstrahlen ihre Energie relativ langsam und im gesamten Strahlenverlauf in das Gewebe abgeben (Abbildung 2) (Weber und Kraft 2009). Dieser niedrige LET ist ein Grund dafür, dass Photonenstrahlung einen Großteil ihrer Wirkung erst durch *indirekte Strahlenwirkungen*, wie z.B. die Radiolyse von Wasser, bei der Radikale entstehen, entfalten kann (Roots und Okada 1975) und sorgt so im Zusammenspiel mit anderen Faktoren für eine relativ geringe relative biologische Wirksamkeit (RBW) (Herrmann et al. 2006).

Eine weitere Eigenschaft lässt sich aus dem Tiefendosisprofil von Photonen ableiten (Abbildung 2) (Weber und Kraft 2009). Hier lässt sich erkennen, dass sich ihr Wirkungsmaximum erst einige Millimeter tief im Gewebe befindet, was darauf zurück zu führen ist, dass in den ersten Millimetern Gewebe sekundär Elektronen gelöst werden, die entscheidend zur Strahlenwirkung beitragen. Dieses Phänomen wird Aufbaueffekt genannt (Laubenberger und Laubenberger 1999), welcher unter anderem für eine Schonung oberflächlicher Areale im Bestrahlungsgebiet genutzt werden kann. Nach dem Wirkungsmaximum nimmt die Energiedosis exponentiell mit der Eindringtiefe ab (Abbildung 2) (G. Kraft

2000). Durch die Verwendung vieler verschiedener Bestrahlungsrichtungen kann jedoch vermieden werden, dass vor dem Tumor liegendes gesundes Gewebe einer höheren Strahlendosis ausgesetzt wird als das Tumorgewebe selbst (G. Kraft 2000).

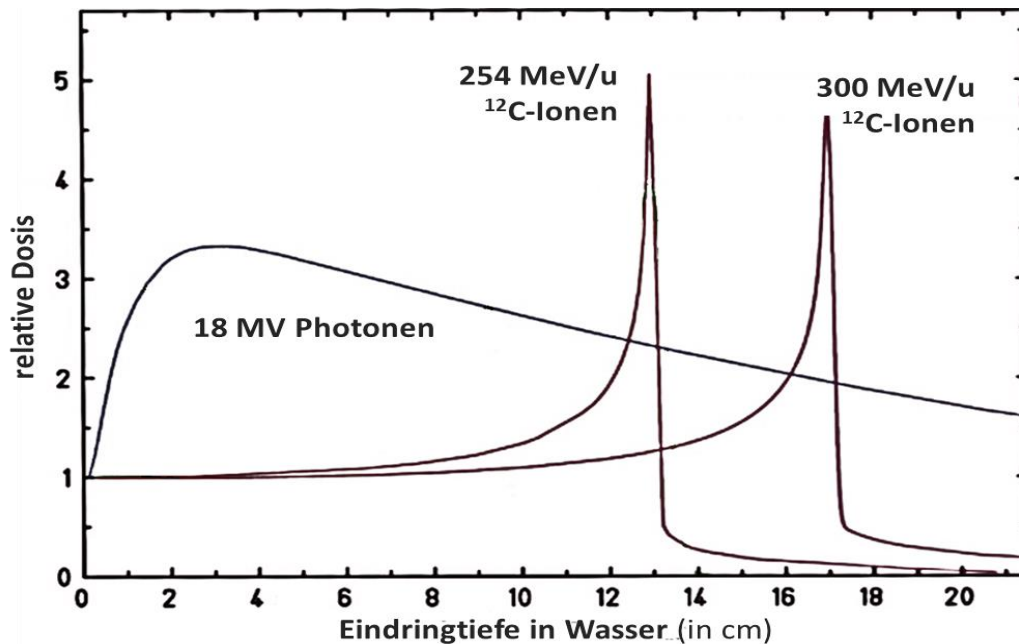


Abbildung 2: Tiefendosisprofil von Photonen und Kohlenstoffionenstrahlung; modifiziert nach Weber und Kraft 2009

1.2.2. Kohlenstoffionenstrahlung

Im Vergleich zu der Photonen- zählt die Kohlenstoffionenstrahlung, wie oben erwähnt, zu den *direkt ionisierenden* Strahlungsarten.

Dies hat mehrere Vorteile. Zum einen hat sie durch einen höheren LET mehr *direkte Strahlenwirkung*, weil sie mit einem Teilchen mehrfach ein Zielmolekül, wie z.B. die DNA, schädigen kann. Dadurch entstehen sogenannte „clustered DNA damage“ (Fokas et al. 2009; Hada und Georgakilas 2008), die nur noch schlecht von den Reparaturmechanismen der Zelle beseitigt werden können (Heilmann et al. 1996). Dies führt wiederum zu einer hohen RBW (Weyrather und Kraft 2004). In vorausgegangenen Versuchen wurde anhand der Dosis, bei der 10% der Zellen überleben und weiterhin Kolonien bilden, eine 3-fach höhere RBW für Kohlenstoffionenstrahlung ermittelt (Abbildung 3) (Kamlah et al. 2011;

Weyrather und Kraft 2004). Das bedeutet, eine Dosis Kohlenstoffionen ist dreimal so wirksam wie die gleiche Dosis Photonen. Daher wurde im Folgenden immer mit den biologisch äquivalent wirksamen Dosen 2 Gy Kohlenstoffionen und 6 Gy Photonen gearbeitet.

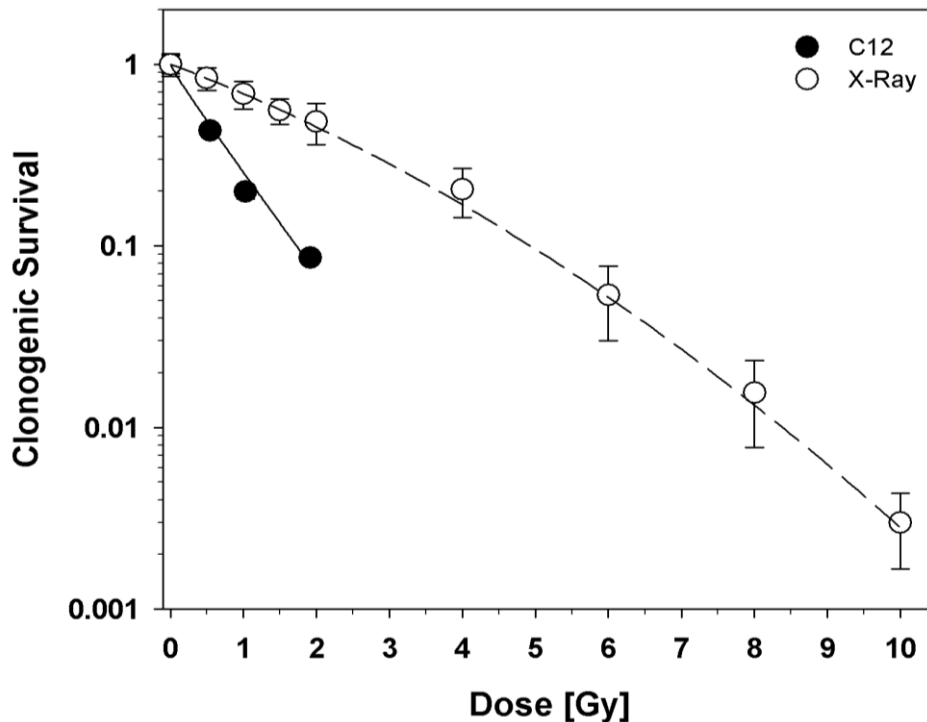


Abbildung 3: Dosis-Effekt-Kurve; Quelle: Kamlah et al. 2011

Ein weiterer Vorteil ist außerdem durch die physikalischen Eigenschaften der Kohlenstoffionen gegeben. Die größere Masse sorgt für ein invertiertes Tiefendosisprofil, welches einen sogenannten *Bragg Peak* aufweist (Abbildung 2) (G. Kraft 2000; Weber und Kraft 2009). Das bedeutet, dass die Strahlung in das Gewebe eindringt und nach einer, von der Strahlenenergie (MeV/u) abhängigen Strecke, den Großteil der Energie in einem relativ kleinen Bereich abgibt (Fokas et al. 2009). Dieser Bereich ist sogar so schmal, dass man um ein bestimmtes Zielvolumen abdecken zu können viele Bragg Peaks von unterschiedlichen Energien nebeneinander legt, um so den Bragg Peak zu verbreitern. Dieser wird dann als *spread-out Bragg Peak* (SOBP) bezeichnet. Dadurch kann die Dosis punktgenau im Gewebe platziert und das umliegende gesunde Gewebe möglichst gut geschont werden.

1.3. Strahlenresistenz & Hypoxie¹

Der Erfolg der angewandten Strahlentherapie hängt von vielen Faktoren ab, unter anderem der „genetisch determinierte[n] Empfindlichkeit von Zellen gegenüber ionisierender Bestrahlung“ (Herrmann et al. 2006, S. 31) oder dem individuellen Tumormikromilieu (W. Mueller-Klieser 2010). Ein weiterer Grund für das Therapieversagen von Photonenbestrahlung können hypoxische Areale in Tumoren sein (Aebersold et al. 2001; Choi et al. 2001; Dellas et al. 2008; Koukourakis et al. 2002; Xueguan et al. 2008). Diese treten in allen soliden Tumoren auf und sind über mehrere Wege für eine erhöhte Strahlenresistenz verantwortlich (Moeller et al. 2004; Semenza 2002b).

Zum einen wird die Radikalbildung verringert und dadurch die *indirekte Strahlenwirkung* eingeschränkt. Dieser Mechanismus wird im Folgenden *chemischer Sauerstoffeffekt* genannt und kann mit dem OER² quantifiziert werden (Vaupel et al. 1989; Brown und Wilson 2004; Gray et al. 1953; Wenzl und Wilkens 2011). Zum anderen wird der Hypoxie-induzierbare-Faktor 1 (HIF-1) stabilisiert, der unter anderem als Resistenzfaktor gegen Photonenbestrahlung wirkt (Ayrapetov et al. 2011; Moeller et al. 2004; Moeller und Dewhirst 2006). Dieser Effekt wird im Folgenden *biologischer Sauerstoffeffekt* genannt und im nächsten Abschnitt näher beschrieben.

1.3.1. Hypoxie-induzierbarer-Faktor 1 (*HIF-1*)

HIF-1 ist ein Heterodimer aus den Einheiten HIF-1 α und HIF-1 β . Es wirkt als Transkriptionsfaktor und kontrolliert so ca. 5% aller Gene des gesamten Genoms (Manalo et al. 2005). Speziell diese Gene helfen der Zelle unter anderem bei der Anpassung an veränderte Sauerstoffbedingungen, was beispielsweise über eine Regulation der Angiogenese, des Glukosetransports oder der Zellproliferation geschieht (Semenza 2001).

Neben diesen beiden Untereinheiten kommen im Menschen weiterhin die Untereinheiten HIF-2 α und HIF-3 α vor. Alle 4 Einheiten besitzen sowohl ein

¹ Sauerstoffmangel

² engl. Oxygen Enhancement Ratio

bHLH³-Element (Abbildung 4), welches für die Bindung an das Hypoxia-responding-element (HRE) sorgt (Wenger et al. 2005), und eine PAS (PER-ARNT-SIM)-Domäne (Abbildung 4), welche für die Dimerisierung der α - und β -Untereinheiten sorgen, und gehören deshalb zu den *bHLH-PAS* Transkriptionsfaktoren. Die α -Untereinheiten besitzen zudem ODDs⁴ (Abbildung 4), welche entscheidend für die sauerstoffabhängige Regulation dieser Einheiten sind. Die β -Untereinheit hingegen besitzt keine ODDs und ist so konstitutiv im Zellkern vorhanden (Wang et al. 1995). HIF-1 α und HIF-2 α unterscheiden sich ansonsten nur minimal, was die Ähnlichkeiten, Überschneidungen aber auch kleinen Unterschiede ihrer Funktionen erklärt (Cheng-Jun Hu et al. 2003). Zu HIF-3 α ist bekannt, dass es, durch die fehlende C-terminale transaktivierende Domäne (CTAD) auch hemmend auf die Transkription der HIF abhängigen Zielgene wirken kann (Makino et al. 2001). In dieser Arbeit steht HIF-1 α wegen seiner Rolle als Resistenzfaktor gegen Photonenbestrahlung im Vordergrund (Unruh et al. 2003).

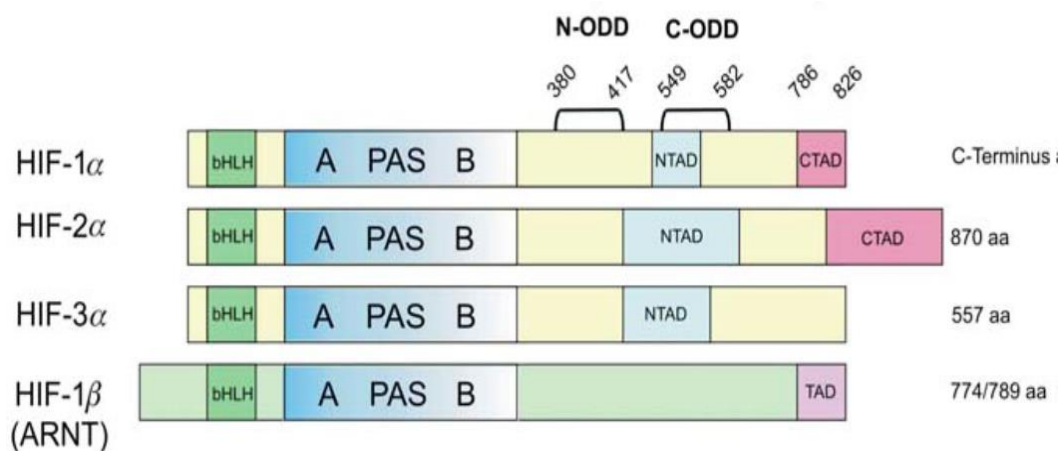


Abbildung 4: Aufbau der HIF-Untereinheiten; schematische Darstellung modifiziert nach Fandrey 2007

Dieses HIF-1 α unterliegt einer sauerstoffabhängigen Regulation durch posttranslationale Modifikation und kann so auf die Veränderung der Sauerstoffbedingungen reagieren. So wird es unter normalen Sauerstoffbedingungen an Prolinresten in den ODDs durch Prolylhydroxylasen

³ engl. Basic Helix-Loop-Helix

⁴ engl. Oxygen Dependent Degradation Domain

(PHD) hydroxiliert (Bruick und McKnight 2001; Ivan et al. 2001). Diese Hydroxilierungen werden mittels des VHL-Proteins⁵ erkannt, welches dafür sorgt, dass HIF-1 α von Ligasen ubiquitiniert und dadurch für den proteasomalen Abbau gekennzeichnet wird (Jaakkola et al. 2001). Weiterhin besitzt es in der CTAD einen Asparaginrest, welcher von FIH-1⁶ hydroxiliert werden kann, was zum Verlust der Fähigkeit zur Aktivierung der Transkription von HIF-1 führt (Abbildung 5)(Mahon et al. 2001).

Diese Inaktivierungen finden unter Hypoxie nicht statt, da die Hydroxylasen dafür unbedingt Sauerstoff benötigen. Dadurch wird unter Hypoxie HIF-1 α nicht abgebaut und geht einen Komplex mit der HIF-1 β -Untereinheit ein, welcher im Zellkern mittels des HRE⁷ die Transkription bestimmter Gene aktiviert (Wang et al. 1995; Rankin und Giaccia 2008) und schlicht als HIF-1 bezeichnet wird.

Diese Aktivierung wird also auf der einen Seite durch die Hypoxie selbst ausgelöst. Auf der anderen Seite gibt es auch unter Normoxie⁸ Mechanismen, die zu einer Ansammlung von HIF-1 führen und dadurch die Transkription der davon abhängigen Zielgene aktivieren. Zu nennen sind hier die Aktivierung bestimmter Signalkaskaden (z.B. der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg) (Harada et al. 2008; Bussink et al. 2008) (Abbildung 5), bestimmte genomische Mutationen (z.B. im PTEN⁹- (Zundel et al. 2000) oder VHL-Protein (Maxwell et al. 1999)) (Abbildung 5) oder eine vermehrte Anwesenheit von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS¹⁰) (Dewhirst et al. 2008).

Diese Hochregulation, unabhängig von dem Mechanismus dahinter, geht in klinischen Studien mit schlechten Prognosen und Therapieversagen einher (Brown und Giaccia 1998; Höckel und Vaupel 2001), sodass die Inhibition von HIF-1 ein vielversprechender Ansatz für die Verbesserung der Therapie von Tumoren ist (Staab et al. 2011).

⁵ Von-Hippel-Lindau ist ein Tumorsuppressor, welcher entscheidend mitverantwortlich für die Ubiquitinierung und damit den Abbau von HIF-1 ist

⁶ engl. Factor Inhibiting HIF-1

⁷ engl. Hypoxia-Response Element

⁸ Normale Sauerstoffbedingungen

⁹ engl. Phosphatase and Tensin homolog; katalysiert die Phosphorylierung von PIP₂ zu PIP₃ und ist damit ein Teil des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs

¹⁰ engl. Reactive Oxygen Species

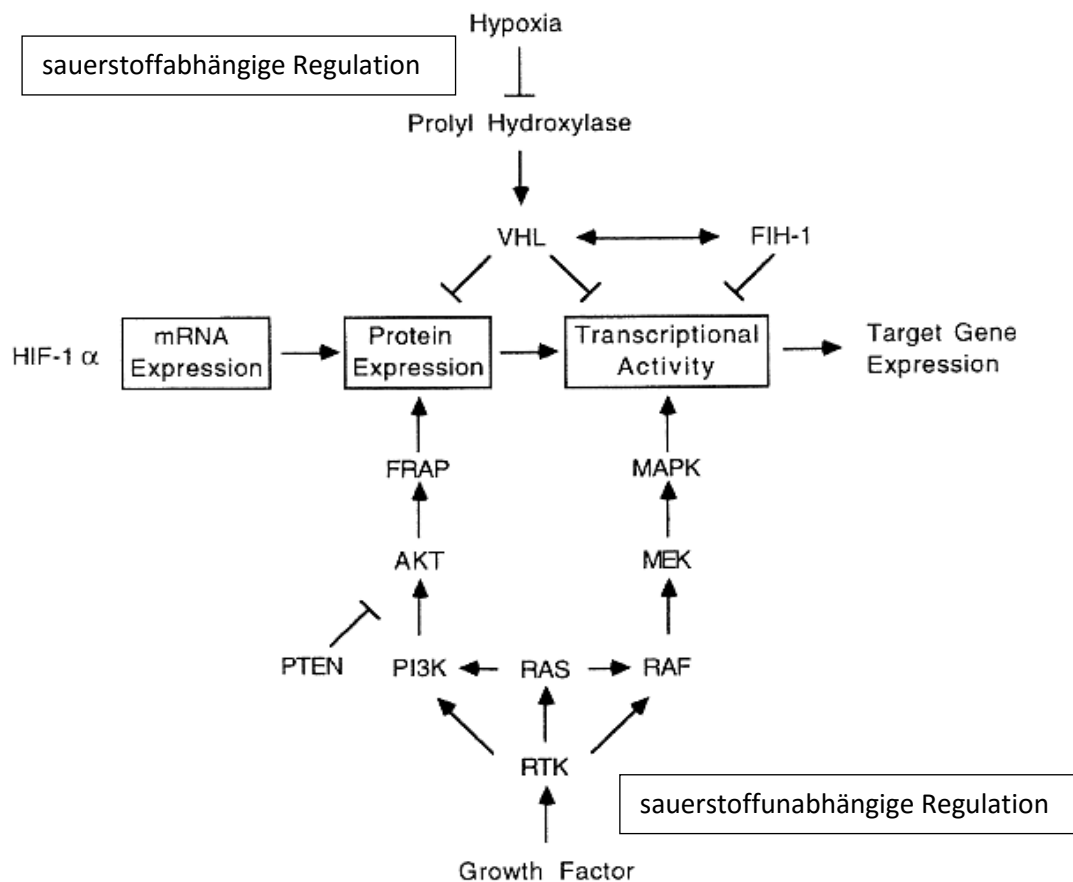


Abbildung 5: HIF-1α Regulation; schematische Darstellung modifiziert nach Semenza 2002a

Weiterhin ist bekannt, dass auch die Bestrahlung mit Photonen HIF-1 stabilisiert und dadurch selbst zu einer erhöhten Strahlenresistenz beiträgt (Dewhirst et al. 2008; Semenza 2002a). In soliden Tumoren spielen hier Mechanismen wie die Reoxygenierung, die Ausschüttung von Stressgranula und die Entstehung von ROS in tumorassoziierten Makrophagen eine wichtige Rolle (Abbildung 5) (Dewhirst et al. 2008; Kedersha et al. 1999; Dorie und Kallman 1984; Li et al. 2007; Semenza 2002a). Einige dieser Mechanismen sind aber unter *in-vitro* Bedingungen zu vernachlässigen, sodass dort wahrscheinlich Mechanismen, wie die Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges ausschlaggebend sind (Harada et al. 2008; Bussink et al. 2008).

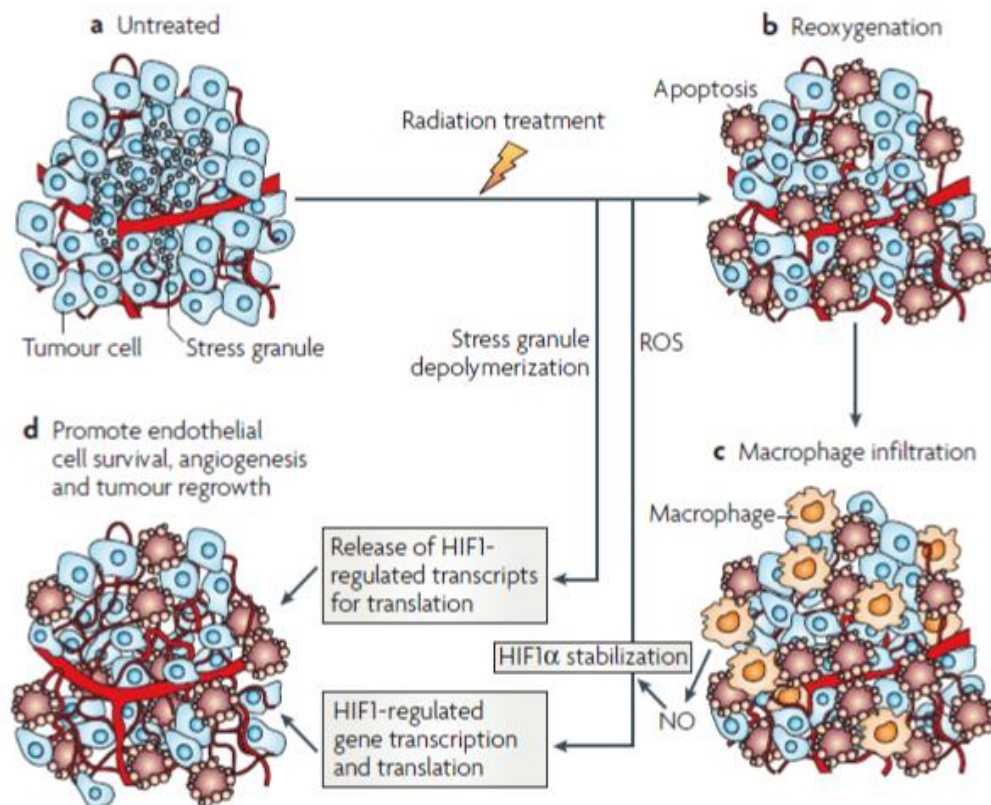


Abbildung 6: Mechanismen der HIF-1 Induktion nach Photonenbestrahlung;
schematische Darstellung aus Dewhirst et al. 2008

1.3.2. HIF-1 abhängige Zielgene

Warum ein hoher HIF-1 Proteinspiegel zu einer Erhöhung der Strahlenresistenz führt, erklärt sich, wenn man die HIF-1 abhängigen Zielgene, die dazugehörigen Proteine und ihre Funktion betrachtet. Es sind über 100 Zielgene bekannt (Semenza 2003). Deshalb sind im Folgenden auszugsweise die Zielgene, mit denen sich diese Arbeit beschäftigt, mit ihrer Funktion vorgestellt.

Zuerst seien der Glucose-Transporter-1 (Glut-1), die Lactatdehydrogenase-A (LDHA) und die Pyruvatdehydrogenase-Kinase-1 (PDK-1) zu nennen, welche unter anderem Schlüsselenzyme der anaeroben Glykolyse sind (Rademakers et al. 2011; Rankin und Giaccia 2008; Sugden und Holness 2003). Durch diese Rolle sind sie für den Metabolismus von Tumoren von besonderer Bedeutung, da Tumorzellen, im Gegensatz zu gesunden Zellen, einen Großteil ihrer Energie auch unter Normoxie aus Milchsäure gewinnen (Sonveaux et al. 2008). Dieser

Mechanismus wird Warburg-Effekt genannt und geht mit gesteigertem Tumorwachstum einher (Schulz et al. 2006).

Neben dem Metabolismus ist eine Versorgung mit neuen Gefäßen, die Angiogenese, ein entscheidender Faktor für das Tumorzellwachstums, da nur mit Sauerstoff versorgte Zellen langfristig überleben können. An dieser Stelle greift der Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) ein (Rankin und Giaccia 2008), der durch Bindung an eine Tyrosinkinase die Angiogenese vermittelt (Dorit Shweiki et al. 1992; Takahashi 2011).

Außerdem wurde der cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1-A oder auch p21) bestimmt, weil er mit zur Regulation des Zellzyklus nach (strahleninduzierten) DNA-Schädigungen beiträgt und so als Bestrahlungsmarker zuverlässig nach Photonen- und Kohlenstoffionenstrahlung hochreguliert wird (Cazzalini et al. 2010; Jakob et al. 2000; Fokas et al. 2009).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die genannten Zielgene von HIF-1 der Tumorzelle beim Überleben unter hypoxischen Bedingungen helfen und deshalb für die erhöhte Radioresistenz mitverantwortlich sind (Rankin und Giaccia 2008).

1.4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Strahlentherapie ist ein wesentlicher Bestandteil der Behandlung von Tumorerkrankungen. Neben der etablierten Photonenstrahlung können einige Zentren seit wenigen Jahren mit Kohlenstoffionen bestrahlen, was einen vielversprechenden Ansatz in der Verbesserung der Tumorthherapie darstellt.

Die Wechselwirkungen zwischen Photonenbestrahlung und HIF-1-Expression, sowie die Folgen dieser Wechselwirkungen sind bekannt, wie sich jedoch der Strahlenresistenzfaktor HIF-1 auf Bestrahlung mit Kohlenstoffionen auswirkt, war weitestgehend ungeklärt. Diese Arbeit soll beispielhaft zeigen, wie sich die HIF-1-Expression und dementsprechend auch die Expression von den HIF-1 abhängigen Zielgenen nach Kohlenstoffionen- im Vergleich zu Photonenstrahlung verhalten und welche Auswirkungen das auf die Strahlentherapie haben könnte. Weiterhin wurde überprüft, was die Ursachen für eine erhöhte HIF-1-Expression sein könnten und wie sich diese verhindern lassen.

Um dies zu untersuchen wurden an zwei humanen Adenokarzinomzelllinien der Lunge (A549/ H1299) zwischen Photonen- und Kohlenstoffionenstrahlung vergleichende Experimente durchgeführt. Weiterhin wurde HIF-1 inhibiert, dies geschah zum einen mittels siRNA-Transfektion und zum anderen durch eine Hemmung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges. Dabei wurden folgende Fragestellungen überprüft:

- Wann kommt es zu einer erhöhten HIF-1-Expression?
- Wie wirkt sich eine erhöhte HIF-1-Expression auf die von HIF-1 abhängigen Zielgene aus?
- Welche Mechanismen stehen hinter einer erhöhten HIF-1-Expression?
- Lässt sich eine erhöhte HIF-1-Expression verhindern?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Gerät	Typ	Firma
Absaugpumpe	Vacusafer Comfort	Integra Biosciences, Zizers, CH
Autoklav	Model UFE 600	Memmert, Schwabach, D
Bioanalyser	2100	Agilent Tech., Palo Alto, CA, US
Densitometrie	ELX 808	BioTEK Instruments GmbH,
Absorptionsreader		Bad-Friedrichshall, D
Einfrierbox	Mister Frosty	Thermo-Scientific, Schwerte, D
Eismaschine	F 100 Compact	Icematic, Meerbusch, D
Entwicklungsmaschine	Curix 60	Siemens, Erlangen, D
GenePix scanner	4100A	Axon Instr., Downingtown, PA, US
Gefrierschrank -20°C	KG N34A10	Bosch, Stuttgart, D
Gefrierschrank -80°C	HERAfreeze Top	Thermo-Scientific, Schwerte, D
Heizrührer	MR 3002	Heidolph, Schwabach, D
Hypoxieinkubator	Innova CO-48	Eppendorf, Hamburg, D
Inkubator	HERAcell	Thermo-Scientific, Schwerte, D
Kryobehälter	Arpege 110	VWR International, Darmstadt, D
Kühlschrank +4°C	KG N34A11	Bosch, Stuttgart, D
Kühlzentrifuge	5430 R	Eppendorf, Hamburg, D
Magnetrührer	MR 1000	Heidolph, Schwabach, D
Mikroskop	DMIL LED	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, D
Nano Drop®	ND-1000	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, D
Spektrometer		
PCR-Gerät	7900 HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems®, Foster City, CA, US
pH-Elektrode	N-61	Schott, Mainz, D

Gerät	Typ	Firma
pH-Meter	766 Calimatic	Knick, Berlin, D
Pipetierhilfe	PIPETBOY acu	Integra Biosciences, Zizers, CH
Pippette 0,2-2 µl	Pipetman Neo P2	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Pippette 100-1000 µl	Pipetman Neo P1000	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Pippette 10-100 µl	Pipetman Neo P100	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Pippette 1-10 µl	Pipetman Neo P10	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Pippette 20-200 µl	Pipetman Neo P200	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Pippette 2-20 µl	Pipetman Neo P20	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Präzisionswaage	Typ AE 240/9	Mettler-Toledo, Gießen, D
Proteinmessung	Elx 808	BioTek, Winooski, USA
Rollschüttler	SRT1	Stuart Scientific, Stone, UK
Sterilbank	Cellguard, N440	Integra Biosciences, Zizers, CH
Taumelschüttler	Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, D
Thermocycler	PCR System 2400	Gene Amp, Foster City, CA, US
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge	Mikro 22R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
Vortexer	Agitateur Top-Mix 11118	Bioblock Scientific, Schwerte, D
Wasseraufbereitungs- anlage	Milli-Q Water Purification System	Millipore, Eschborn, D
Wasserbad	MW-Z	Julabo Labortechnik, Seelbach, D
Zentrifuge	Mikro 200 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D

Tabelle 1: Materialien

2.1.2. Verwendete PC-Programme

Programm	Firma
Citavi	Swiss Academic Software, CH
Gen5™	BioTek, Winooski, US
GenePix Pro 5.0	Axon Instr., Downingtown, PA, US
Graph Pad Prism	Graph Pad Software Inc., San Diego, US
Image Lab	Bio-Rad Laboratories, Münschen, D
Microsoft Excel 2007	Microsoft Corp., Redmond, WA, US
SDS 2.3	Applied Biosystems®, Foster City, CA, US

Tabelle 2: verwendete PC-Programme

2.1.3. Hilfs- & Verbrauchsmittel

Bezeichnung	Firma
Alu Rack	Roth, Karlsruhe, D
Amersham Hyperfilm ECL	Amersham, Buckinghamshire, GB
Bottle-top Filter, Gewinde 33 mm, 45 mm	Millipore Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland
Cronex 5, 18x24, 100 NIF, Medical X-Ray Film	AGFA
Deckel für Reaktionsgefäße 0,2 ml gewölbt	Nerbe Plus, Winsen/Luhe, D
Deckgläschen 21 x 26 mm	Gerhard Menzel, Braunschweig, D
Diamond Filtertips sterile 0,1-10 µl	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Diamond Filtertips sterile 100-1000 µl	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Diamond Filtertips sterile 10-100 µl	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Diamond Filtertips sterile 20-200 µl	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Diamond Filtertips sterile 2-30 µl	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Falcons 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Filterspitze PP natur 0,5-10 µL	Sarstedt, Nümbrecht, D
Filterspitze PP natur 0-100 µL	Sarstedt, Nümbrecht, D
Filterspitze PP natur 0-20 µL	Sarstedt, Nümbrecht, D
Filterspitze PP natur 0-200 µL	Sarstedt, Nümbrecht, D

Bezeichnung	Firma
Filterspitze PP natur 100-1000 µL	Sarstedt, Nümbrecht, D
Blottingpaper	GE Healthcare, Solingen, D
Handschuhe, Microtouch Nitra-TEX, L	Ansell Healthcare, Brüssel, B
Handschuhe, Microtouch Nitra-TEX, M	Ansell Healthcare, Brüssel, B
Hypercassette™	Amersham, Buckinghamshire, GB
Hyper™ ECL-Filme	Amersham, Freiburg, D
Kryoboxen	Roth, Karlsruhe, D
Mikro-Röhren, 2 mL, Typ I mit Stehrand	Sarstedt, Nümbrecht, D
Mikrotestplatten, 96er, gerader Boden	Sarstedt, Nümbrecht, D
Neubauer-Kammer	Brand, Wertheim, D
PCR Workstation	Roth, Karlsruhe, D
PCR-Einzelgefäße, 0,5 mL 2000per VE	Sarstedt, Nümbrecht, D
PCR-Racks	Roth, Karlsruhe, D
PVDF Hybond P 20*20 cm	Amersham, Buckinghamshire, GB
Rastereinsatz	Roth, Karlsruhe, D
Reaktionsgefäße, pp, Natur, 0,2 mL Streifen, ohne Deckel	Nerbe Plus, Winsen/Luhe, D
Rotilab PCR-Racks	Roth, Karlsruhe, D
Rotilab-Eiswanne	Roth, Karlsruhe, D
Safe-lock Tubes, farblos, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Safe-lock Tubes, farblos, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Superplate PCR Detectionplate	Thermo-Scientific
T 25 Zellkulturflaschen mit Gasaustauschkappe	BD, Heidelberg, D
T 25 Zellkulturflaschen mit Polyethylenkappe	BD, Heidelberg, D
T 75 Zellkulturflasche mit Gasaustauschkappe	Sarstedt, Nümbrecht, D

Tabelle 3: Hilfs- & Verbrauchsmittel

2.1.4. Lösungen & Kits

Bezeichnung	Firma
2-Propanol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Agarose	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
APS	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aqua Ecotainer®	B.Braun, Melsungen, D
Aqua Stabil	Julabo Labortechnik, Seelbach, D
BSA (Bovines Serum Albumin)	PAA Laboratories, Pasching, AUT
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, D
DMSO (Dimethyl sulfoxide ≥ 99,5%)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
dNTP Mix 10mM	Fermentas, Bonn, D
DPBS	PAN-Biotech, Aidenbach, D
ECL-Plus-Kit	GE Healthcare, Solingen, D
Ethanol >99,5% reinst	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol 70% vergällt	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol absolut	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
FCS (fetal calf serum)	PAN-Biotech, Aidenbach, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
Glycin >99%	Roth, Karlsruhe, D
Guanidinhydrochlorid	Roth, Karlsruhe, D
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen™, Darmstadt, D
Magnesium Chlorid	Invitrogen™, Darmstadt, D
Methanol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
NaCl	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Oligo(dT) ₁₈ primer	Fermentas, Bonn, D
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, GlutaMAX™	Gibco®, Darmstadt, D
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech, Aidenbach, D
peqGold TriFast	PEQLAB Biotech., Erlangen, D
Pierce Protein Assay Kit (#23227)	Thermo-Scientific, Bonn, D

Bezeichnung	Firma
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen™, Darmstadt, D
Quantikine Human VEGF-Kit (# DVE00)	R&D Systems, Wiesbaden, D
Reaction Buffer (bei Oligo(dT) ₁₈ primer)	Fermentas, Bonn, D
RevertAid™ Reverse Transcriptase	Fermentas, Bonn, D
RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas, Bonn, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, D
RPMI 1640 m. L-Glutamin	PAN-Biotech, Aidenbach, D
Schwefelsäure 1mol/L	Roth, Karlsruhe, D
SDS solution	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe, D
Skim Milk Powder	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo-Scientific, Bonn, D
Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder	Thermo-Scientific, Bonn, D
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Trypsin 0,5%/EDTA 0,2%	PAN-Biotech, Aidenbach, D
Tween 20	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US

Tabelle 4: Lösungen & Kits

2.1.5. Gebrauchslösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x Probenpuffer	625 mM Tris pH 6,8 + 20% SDS + 50% Glycerol + 0,3% Bromphenol + 9% Mercaptoethanol (V/V).
10x SDS-PAGE	30 g Tris + 188 g Glycin + Ad 900 ml H ₂ O + 100 ml SDS 20%
10x TBS	80 g NaCl + 24,2 g Tris ad 1 l ddH ₂ O (pH = 7,6)
5% Stackinggel	5,7 ml ddH ₂ O + 1,7 ml 30% Degased Acrylamid (Gel30) + 2,5 ml 0,5M Tris-HCL (pH6,8) + 100 µl 10% w/v SDS + 5 µl TEMED +100 µl APS (10%)
8% Trenngel	7 ml ddH ₂ O + 2,7 ml 30% Degased Acrylamid (Gel30) + 2,5 ml 1,5M Tris-HCL (pH8,8) + 100 µl 10% w/v SDS + 5 µl TEMED +100 µl APS (10%)
Blockingpuffer	Waschpuffer + 5% skim milk powder
cDNA-Mastermix	4 µl 5x Reaction Buffer + 0,5 µl RiboLock + 2 µl dNTP Mix + 1 µl Reverse Transkriptase (je Probe)
Kryomedium	RPMI1640 + 10% FCS + 5% DMSO
Kulturmedium	RPMI1640 + 10% FCS + 1% P/S
Modifizierter 1x Lämmli-Puffer	1 ml 1x Lämmli-Puffer + 40 µl Complete + 5 µl Na- Orthovanadat + 4 µl Na-Fluorid
PCR-Mastermix	12,5 µl SYBR Green + 1 µl MgCL + 9,5 µl H ₂ O + 1 µl Primergebrauchslösung
Primergebrauchslsg.	80 µl H ₂ O + 10 µl forward Primer + 10 µl reverse Primer
siRNA-Medium	1 ml Optimem + 8 µl siRNA + 8 µl Lipofectamin
Strippingpuffer	5 ml 1 M Glycin + 5 ml ddH ₂ O + 500 µl rauchende HCl
Transfektionsmedium	50% RPMI 1640 + 50% Optimem
Transferpuffer	3,2 g Tris + 14,4 g Glycin ad 800 ml H ₂ O + 200 ml Methanol + 10 ml 10%(w/v)SDS
Waschpuffer	100 ml 10x TBS + 0,05% Tween20

Tabelle 5: Gebrauchslösungen

2.1.6. siRNA-Sequenzen

Bezeichnung	Sense 5'-3'	Firma
siHIF-1 α -ratcliffe -	-uca agu ugc ugg uca uca g-	biomers.net, Ulm, D
siHIF-1 α -ratcliffe +	-cug aug acc agc aac uug a-	biomers.net, Ulm, D
siRandom -	-uug aug ugu uua guc gcu a-	biomers.net, Ulm, D
siRandom +	-uag cga cua aac aca uca a-	biomers.net, Ulm, D

Tabelle 6: siRNA-Sequenzen

2.1.7. Antikörper

Antikörper	Firma	Bestellnummer
Anti-HIF 1 α	BD, Heidelberg, D	610959
Anti-mTOR	Cell Signaling, Danvers, MA, US	#2972
Anti-phospho-mTOR (ser2448)	Cell Signaling, Danvers, MA, US	#2971
Anti- β Actin	AbCam, Cambridge, UK	ab8227
goat Anti-Mouse	Pierce, Rockford, IL US	31432
goat Anti-Rabbit	Pierce, Rockford, IL US	31462

Tabelle 7: Antikörper

2.1.8. Primer

Primerbez.	Primersequenz (5' – 3')	Annealing-Temp. (°C)	Amplifikationslänge
CDKN1A	F: GGAAGACCATGTGGACCTGT	59,82	146 bp
	R: GGC GTTTGGAGTGGTAGAAA	60,11	
GLUT-1	F: CTTCACTGTCGTGTCGCTGT	60,10	195 bp
	R: CCAGGACCCACTTCAAAGAA	60,08	
LDHA	F: TGTGCCTGTATGGAGTGGAA	60,11	124 bp
	R: AGCACTCTCAACCACCTGCT	60,06	
PBGD	F: CAGCTTGCTCGCATACAGAC	59,77	106 bp
	R: GAATCTTGTCCTCTGTGGTG	60,36	
PDK-1	F: GGTTACGGGACAGATGCAGT	60,00	109 bp
	R: CGTGGTTGGTGTGTAATGC	59,89	
VEGF-A	F: AGGCCAGCACATAGGAGAGA	59,97	133 bp
	R: TTTCTTGCGCTTTCGTTTTT	60,00	

Tabelle 8: Primer

2.2. Zellkultur

Mittels Zellkultivierung von humanen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien wurden die Proben erzeugt, die hinterher im Hinblick auf Protein- und mRNA-Expression untersucht wurden. Hierfür mussten die Zellen mehrfach wöchentlich kultiviert werden und je nach Versuchsprotokoll zum passenden Zeitpunkt mit siRNA transfiziert, in hypoxischen Bedingungen inkubiert und/ oder bestrahlt werden.

2.2.1. Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die humanen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien **A549** (ATCC- (American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA)) Nr.: CCL-185) und **H1299** (ATCC-Nr.: CRL-5803) untersucht.

Die Zelllinie A549 wurde 1972 von D.J.Giard et al. aus einem 58-jährigen männlichen Kaukasier gewonnen und etabliert. Die Zellen besitzen einen hypotriploiden Chromosomensatz (ATCC).

Die Zelllinie H1299 wurde von Dr. A. Gazdar und Dr. J. Minna aus einem 43-jährigen männlichen Kaukasier isoliert. Die Zellen besitzen eine homozygote partielle Deletion des p53-Proteins und sind somit p53-negativ (ATCC).

2.2.2. Zellkultivierung

Beide Zelllinien wurden bei 21% O₂, 5% CO₂, 37 °C und maximaler Luftfeuchte in einem Brutschrank mit Kulturmedium (Tabelle 5) inkubiert und zwei bis dreimal wöchentlich, bei einer Zelldichte von 80-90%, passagiert.

Dazu wurden alle Lösungen vorher im Wasserbad auf 37 °C erwärmt, das alte Medium unter der Sterilbank abgesaugt und verworfen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturflasche gelöst und mit Kulturmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:10 mit frischem Kulturmedium verdünnt und zur Weiterkultivierung auf T-75er Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.3. Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen, wie oben beschrieben, von der Zellkulturflasche gelöst, mit Kulturmedium resuspendiert und 10 µl der Zellsuspension entnommen um die Zellen unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Neubauer-Kammer auszuzählen. Die Gesamtzahl an Zellen wurde danach anhand folgender Formel errechnet:

$$\text{Teilchen pro } \mu\text{l Volumen} = \frac{\text{Ausgezählte Teilchen}}{\text{Ausgezählte Fläche (mm}^2\text{) x Kammertiefe (mm) x Verdünnung}}$$

Währenddessen wurde die Zellsuspension 5 min bei 248 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das dabei entstandene Pellet wurde schließlich mit 1 ml Medium pro 1 Mio. Zellen gelöst und anschließend dem späteren Zweck entsprechend weiterbehandelt.

2.2.4. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Um die Zellen längerfristig aufzubewahren, wurden die Zellen bei -190 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Dazu wurden die Zellen, wie oben beschrieben, gezählt, das Pellet in 1 ml Kryomedium (Tabelle 5) pro 1 Mio. Zellen gelöst und je 2 ml dieser Suspension in ein Kryoröhrchen gegeben. Die Kryoröhrchen wurden daraufhin in einer Einfrierbox 24 h lang bei -80 °C schrittweise um 1 °C pro Stunde heruntergekühlt und danach längerfristig in flüssigem Stickstoff bei -190 °C gelagert.

Um die Zellen nach der Lagerung erneut zu kultivieren, wurde die Zellsuspension in den Kryoröhrchen zügig aufgetaut und mit Kulturmedium auf T-75er Zellkulturflaschen gegeben. 24 h später wurde das bis dahin DMSO enthaltende Medium abgesaugt und durch neues Kulturmedium ersetzt. Danach wurden die aufgetauten Zellen noch mindestens zweimal passagiert, bevor sie für Versuche eingesetzt wurden.

2.2.5. Versuchsablauf

Im Großen und Ganzen wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Zellkulturexperimente durchgeführt. Zum einen wurde mittels siRNA-Transfektion die Expression von HIF-1 α inhibiert, zum anderen durch die Zugabe von Rapamycin die mTOR¹¹ Phosphorylierung inhibiert.

Für die Versuche mit Inhibition von HIF-1 α wurden die Zellen 72 h vor dem Bestrahlungstermin mit einer vorher definierten Anzahl auf ventilierte (Normoxie) und nicht-ventilierte (Hypoxie) T-25er Platten ausgesät. 24 h später wurden sie mittels siRNA transfiziert (s. 2.2.6.). Weitere 24 h später wurde ein vollständiger Mediumwechsel durchgeführt, um die Zellkulturbedingungen für den restlichen Versuch optimal zu gestalten, außerdem wurden die Zellen den verschiedenen Sauerstoffbedingungen ausgesetzt (s. 2.2.8.). Noch einmal 24 h später (Stunde 0) wurden die Zellen bestrahlt (s. 2.2.9.) und daraufhin entweder 48 h später gestoppt (s. 2.2.10.) oder 72 h später die Zellkulturüberstände entnommen. Vereinfacht sind diese Abläufe in folgender Abbildung dargestellt:

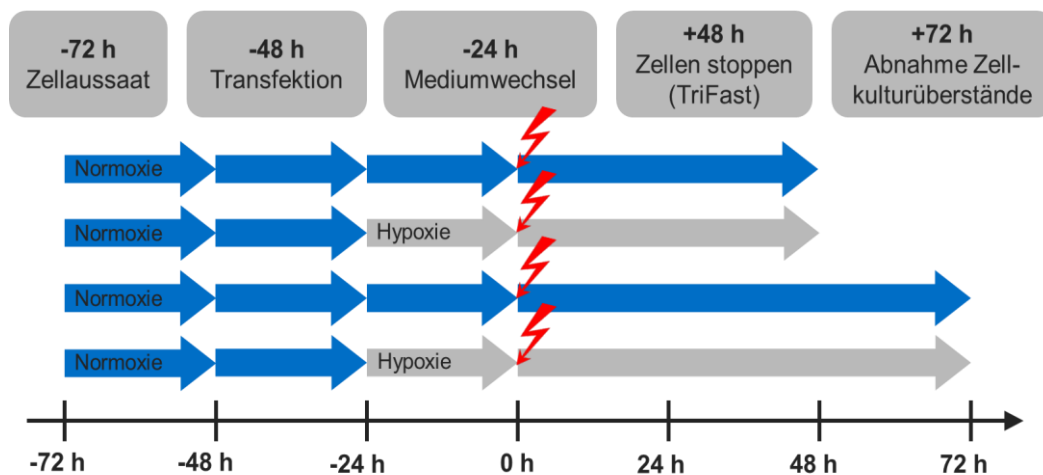


Abbildung 7: Zeitlicher Ablauf der HIF-Inhibitionsversuche; schematische Darstellung

Für die Versuche, in denen die mTOR-Phosphorylierung inhibiert werden sollte, wurden die Zellen 48 h vor der Bestrahlung in einer vorher definierten Zellzahl ausgesät und unter normoxischen Zellkulturbedingungen bis 1 h vor der

¹¹ engl. mammalian Target of Rapamycin

Bestrahlung inkubiert. Dann wurde den Proben entweder DMSO oder Rapamycin zugegeben (s. 2.2.7.). Anschließend wurden die Zellen wieder bis zur Bestrahlung inkubiert, dann bestrahlt (s. 2.2.9.) und 6 h nach der Bestrahlung gestoppt (s. 2.2.10.). Auch diese Abläufe lassen sich in vereinfachter Weise folgender Abbildung entnehmen:

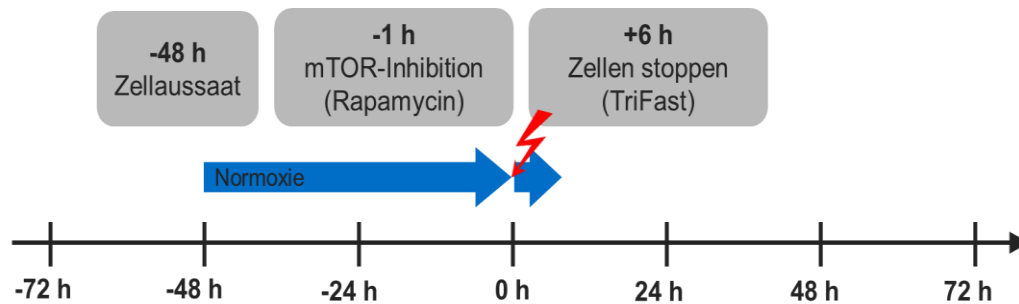


Abbildung 8: Zeitlicher Ablauf der Rapamycinversuche; schematische Darstellung

2.2.6. HIF-1 α Inhibition

Um selektiv einzelne RNAs zu inhibieren wurden spezifische siRNAs, mit aus der Literatur bekannten Sequenzen verwendet (Hedi M. Sowter 2003; Hänze et al. 2003). Als Kontrolle (siRandom) wurde eine Sequenz verwendet, die laut MicroArray Analysen, kein Gen im humanen Genom beeinflusst (Dharmacon Inc., Chicago, IL, USA).

Die Einzelstränge der siRNA (Tabelle 6) wurden von Biomer als Trockensubstanz geliefert und bei RT gelagert. Diese mussten vor Gebrauch so mit Wasser gelöst werden, dass pro 1 μ l 100 pmol siRNA enthalten waren. Danach mussten 40 μ l des Vorwärts-Strang mit 40 μ l des Rückwärts-Strang und 20 μ l Puffer gemischt werden, sodass man 100 μ l siRNA (40 μ M) erhielt. Jene wurden vor Gebrauch noch 1 min auf 96 °C erhitzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach konnte die siRNA längerfristig bei -20 °C gelagert oder direkt für die Transfektion verwendet werden.

Für die siRNA-Transfektion der Zellen wurde an einem vorher definierten Tag des Versuches (Abbildung 7) das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und 3 ml Transfektionsmedium (Tabelle 5) auf die Zellen gegeben.

Zusätzlich wurde in jede Zellkulturflasche 1 ml des entsprechenden siRNA-Mediums (Tabelle 5) hinzugegeben.

4-6 h später wurde noch einmal 1 ml Kulturmedium (FCS enthaltend) hinzugefügt, wodurch die Transfektion gestoppt wurde. Letztlich wurde 24 h später ein Mediumwechsel mit Kulturmedium durchgeführt um die Kulturbedingungen für die Dauer des restlichen Versuches optimal zu gestalten.

2.2.7. mTOR-Inhibition

Für die mTOR-Inhibition wurde den Proben 1 h vor der Bestrahlung 80 µl 2500 nM Rapamycins zugegeben, was im Endeffekt einer Konzentration von 50 nmol/l entspricht. Alternativ wurde als Kontrolle die gleiche Menge an DMSO zugegeben. Danach wurde weiter wie vorher beschrieben verfahren (s. 2.2.5.).

2.2.8. Sauerstoffbedingungen

Um die Zellen unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen aussetzen zu können, wurden sie in ventilierte (Normoxie) und nicht-ventilierte (Hypoxie) Zellkulturflaschen ausgesät.

Die Proben, die weiterhin unter normoxischen Bedingungen wachsen sollten, sind über die gesamte Zeit des Versuches in ventilierten Zellkulturflaschen, unter den weiter oben beschriebenen Zellkulturbedingungen, inkubiert und behandelt worden (s. 2.2.2.).

Die Proben, die hypoxischen Bedingungen ausgesetzt werden sollten, sind an einem vorher festgelegten Tag in nicht-ventilierten Zellkulturflaschen mit geöffnetem Deckeln für 24 h im Hypoxieinkubator (bei 1% O₂) inkubiert worden. Anschließend wurden die Flaschen schnellstmöglich nach Öffnen des Inkubators geschlossen um die Hypoxie im Inneren aufrecht zu erhalten. Dieses Verfahren wurde in vorausgeschalteten Arbeiten überprüft (Bill und Engenhart-Cabillic 2013).

2.2.9. Bestrahlung

Für die Bestrahlung der Zellen wurden biologisch äquivalente Dosen von Photonen und Kohlenstoffionen benutzt, diese wurden in vorgeschalteten Versuchen bestimmt (Kamlah et al. 2011).

Für die Bestrahlung mit Photonen bedeutet das in unserem Modell eine Dosis von 6 Gy mit einer Energie von 6 MV und einer Dosis-Rate von 3 Gy/min, die an einem in der Klinik gebräuchlichen Linear Beschleuniger (Elekta GmbH; Alsterdorfer Markt 4; 22297 Hamburg) erzeugt wurden.

Die Bestrahlung mit Schwerionen wurde im GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung in Darmstadt realisiert. Es wurden 2 Gy Kohlenstoffionen (^{12}C -Ionen) mit einer Energie von 120.45-135.16 MeV/u, einem LET von 70 keV/ μm und einem SOBP von 10 mm verwendet.

2.2.10. Zellen stoppen

Nach entsprechender Behandlung wurden die Zellen gestoppt, um schließlich Proteine und RNA aus ihnen isolieren zu können. Außerdem wurden die Zellkulturüberstände für die Auswertung im ELISA¹² abgenommen.

Um den Zellzyklus möglichst früh während des Stoppprozesses zu unterbrechen, wurden die folgenden Schritte alle auf Eis durchgeführt. Zuerst wurde das Kulturmedium abgenommen und in 15 ml Falcons für weitere Analysen bei -80 °C eingefroren. Dann wurden die Zellen zweimal mit kaltem DPBS gewaschen und schließlich mit 1 ml peqGOLD TriFast und unter Verwendung eines Zellschabers von der Kulturflasche gelöst. Die dadurch entstandene TriFast Zellsuspension wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

Mit Hilfe dieser Methode war es uns möglich sowohl Proteine als auch RNA aus derselben Probe zu extrahieren und zu untersuchen; dies war insbesondere bei Proben, die mit Schwerionen bestrahlt wurden, von besonderer Bedeutung, da der Zugang zu dieser Strahlung sehr begrenzt ist.

¹² engl. enzyme linked immunosorbent assay

Um RNA und Proteine voneinander zu trennen, wurden 0,2 ml Chloroform pro 1 ml Trifast zugegeben, dadurch bildeten sich eine obere farblose wässrige Phase (RNA), eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase (Proteine) und eine milchige Interphase (DNA + Zellabfall). Daraufhin wurde die milchige Phase verworfen und die wässrige und rote Phenol-Chloroform-Phase wurde je in ein neues Cup überführt und wie weiter unten beschrieben weiterverarbeitet (s. 2.3./ 2.4.).

2.3. Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Mit Hilfe der quantitativen Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ist es möglich einzelne mRNA Sequenzen spezifisch zu amplifizieren und dadurch zu quantifizieren. Dies geschieht durch eine Umschreibung der mRNA in cDNA mittels der Reversen Transkriptase und anschließender exponentieller Vervielfachung und wiederholter Signaldetektion in der Real-Time PCR.

2.3.1. RNA-Isolation

Die RNA wurde aus der wässrigen Phase der TriFast Zellsuspension gewonnen, der erste Schritt (die Trennung von den Proteinen) ist weiter oben beschrieben (s. 2.2.10.). Folgende Schritte wurden alle auf Eis und mit RNase freiem Material durchgeführt, da sonst die Gefahr einer Degradation der RNA bestand.

Zuerst wurde die RNA präzipitiert. Dies geschah, indem der wässrigen Phase 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml TriFast hinzugefügt, die Probe gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 4 °C und 14'000 g abzentrifugiert wurde. Das dabei entstandene Pellet wurde im Anschluss daran zweimal mit 75% Ethanol gewaschen und je 10 min bei 4 °C und 14'000 g abzentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet noch 20 min mit offenem Deckel getrocknet und anschließend wieder mit RNase freiem Wasser gelöst.

2.3.2. RNA-Messung

Im Anschluss an die RNA-Isolation wurde der RNA-Gehalt der Proben ermittelt, dies geschah mit Hilfe des NanoDrop Gerätes, welches die Lichtabsorption einer Flüssigkeit, bei unterschiedlichen Wellenlängen, ermittelt und daraus die Konzentration von RNA und den Reinheitsgrad der Probe berechnet. Für die Bestimmung der Reinheit wurde der Absorptionsquotient der Wellenlängen 260/280 (optische Dichte bei 260 nm und 280 nm) benutzt, welcher zwischen 1.65 und 2.00 liegen musste.

Dafür wurde 1 µl der Probe benötigt und entweder unverdünnt oder 1:10 mit RNase freiem Wasser verdünnt eingesetzt.

2.3.3. cDNA-Herstellung

Um die isolierte RNA mittels qRT-PCR analysieren zu können, musste sie erst in DNA umgeschrieben werden. Für die Herstellung der sogenannten cDNA wurde 1 µg der RNA mit 1 µl Oligo(dt)18 Primer versetzt und diese Probe mit RNase freiem Wasser zu 12,5 µl Volumen ausgeglichen. Dieser Ansatz wurde mit Hilfe des Thermocyclers 5 min bei 65 °C inkubiert um eine Bindung der Primer zu gewährleisten.

Danach wurden zu jeder Probe 7,5 µl cDNA-Mastermix (Tabelle 5) gegeben. Im Anschluss daran wurden die Proben erst 60 min bei 42 °C und dann 10 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert und währenddessen die RNA, mittels reverser Transkription, in cDNA umgeschrieben. Die cDNA konnte danach bis zur Benutzung bei -20 °C weggefroren oder sofort verwendet werden.

2.3.4. Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (q-PCR)

Für die q-PCR wurden je 1 µl der vorher hergestellten cDNA mit 24 µl des PCR-Mastermix (Tabelle 5) in die Wells der 96 Chamber-PCR-Platten pipettiert und die Platten abzentrifugiert. Danach wurden die Platten im PCR-Gerät 2 min auf 50 °C erhitzt, um die Taq-Polymerase zu aktivieren. Zur Amplifikation wurden sie im Anschluss 45 Zyklen lang 5 s auf 95 °C (Denaturierung), 5 s auf 60 °C (Annealing;

Signaldetektion) und 10 s auf 72 °C (Elongation) erhitzt. Dabei wurde während jedes Annealing Schrittes die Fluoreszenz und dadurch die Menge an doppelstrang DNA bindendem SYBR-Green gemessen. Sobald dieser Wert deutlich über den Hintergrund anstieg und in die exponentielle Vervielfältigungsphase überging, wurde der Grenzwert (threshold) für die Bestimmung des ct (cycle threshold) gesetzt.

Mit Hilfe der Schmelzkurvenbestimmung wurde im Anschluss daran durch eine schrittweise Erhitzung von 72 °C auf 95 °C und wiederholter Signaldetektion verifiziert, ob die richtige DANN-Sequenz amplifiziert wurde (s. 2.3.5.).

2.3.5. Primertest

Die in dieser Arbeit benutzten Primer (Tabelle 8) wurden in vorausgeschalteten Arbeiten überprüft (Bill und Engenhardt-Cabillic 2013). Dafür wurde die Primereffizienz und –spezifität bestimmt. Seit dem wurden die PCR-Produkte anhand ihrer Schmelzkurven identifiziert und überprüft.

2.3.6. Auswertung

Die durch die qRT-PCR erhaltenen ct-Werte wurden mittels der Formel:

$$\Delta ct = ct (\text{Referenzgen}) - ct (\text{Zielgen})$$

gegen das Referenzgen, hier Porphobilinogen Deaminase (PBGD), normalisiert und so in Δct -Werte umgerechnet. Diese Δct -Werte wurden daraufhin mittels der Formel:

$$\Delta \Delta ct = \Delta ct (\text{Behandlung}) - \Delta ct (\text{Kontrolle})$$

gegen die Kontrolle normalisiert. Diese $\Delta \Delta ct$ -Werte wurden auf einer 2-log Skala als Expressionsunterschiede des jeweiligen Gens dargestellt.

2.4. Western Blot

Mit dem Western- oder auch Immunoblot war es uns möglich die Proteine nach ihrer Molekulargröße aufzutrennen und sie anschließend spezifisch, mittels monoklonaler Antikörper, darzustellen. Durch die Densitometrie im Anschluss

daran ist es weiterhin möglich, eine semiquantitative Aussage über die Proteinmengen zu treffen.

2.4.1. Protein-Isolation

Die Proteine wurden aus der unteren roten Phenol-Chloroform-Phase der TriFast Zellsuspension gewonnen. Der erste Schritt (die Trennung von der RNA) ist weiter oben beschrieben (s 2.2.10.). Danach wurden die Proben mit dem 3-fachen Volumen Isopropanol versetzt, gemischt, 10 min bei RT inkubiert und 10 min bei 4 °C und 12'000 g zentrifugiert, sodass sich die Proteine als Pellet am Boden des Cups abgesetzt haben.

Dieses Pellet wurde im Anschluss daran je dreimal mit 0,3M Guanidinhydrochlorid in 95% Ethanol gewaschen, 20 min bei RT inkubiert und 5 min bei 4 °C und 9'000 g zentrifugiert. Außerdem wurde ein vierter Waschdurchgang mit 99,8% Ethanol angeschlossen und erneut 20 min bei RT inkubiert, sowie 5 min bei 4 °C und 9'000 g zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet noch 5 min mit offenem Deckel im Vakuum bei 1'000 g zentrifugiert, dadurch getrocknet und anschließend wieder mit 80 µl modifiziertem 1xLämmli Puffer (Tabelle 5) gelöst.

2.4.2. Proteinmessung

Die Proteinmessung wurde mit dem Pierce Protein Assay Kit (#23227) durch den Bradford-Test durchgeführt. Dazu musste zuerst eine Verdünnungsreihe an Albuminstandards als Referenz hergestellt und die Proben 1:10 mit Puffer verdünnt werden. Sowohl von den Standards als auch von den Proben wurde immer zweimal 25 µl auf eine Microtest 96-Well Platte pipettiert und 200 µl Working Reagenz des Kits dazu gegeben. Danach wurde die Platte 30 sec auf einem Rüttler bei RT und 30 min bei 37 °C inkubiert und die Werte schließlich als Duplett gemessen. Die Ergebnisse wurden für die Benutzung im Western Blot in µg/µl umgerechnet.

2.4.3. Gelherstellung & Probenvorbereitung

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden zuerst 8% Trenngele (Tabelle 5) gegossen. Diese wurden zum Aushärten mit 70% Ethanol überschichtet. Danach wurden diese Gele mit 5% Stackinggelen (Tabelle 5) übergossen, welche mit einem 15 mm Kamm luftdicht verschlossen wurde und so aushärten konnten.

Pro Tasche im Gel wurden 25 µg Protein eingesetzt, diese mit Wasser zu 27 µl Volumen ausgeglichen und mit 3 µl 10x Probenpuffer (Tabelle 5) degradiert. Zur Degradation wurden die Proben außerdem 5 min bei 110,8 °C gekocht.

2.4.4. SDS-Gelelektrophorese

Die Taschen im Stackinggel wurden mit jeweils 25 µl der degradierten Proben bzw. 25 µl des Markers zur Beurteilung der Proteingröße beladen. Alle bis dahin leeren Taschen des Gels wurden im Anschluss mit 25 µl des 1x Probenpuffer gefüllt, um gerade Banden zu gewährleisten.

So bestückt wurden die Gele ungefähr 1,5 h lang in 1 l 1x SDS-Page (100 ml 10xSDS-Page (Tabelle 5) + 900 ml ddH₂O) bei 100 V laufen gelassen, bis sich die Proteine entsprechend ihrer Größe im Trenngel aufgetrennt hatten.

2.4.5. Blotting

Für das Blotten wurde ein Nass-Nass Blotting System von BioRad verwendet. Dazu wurden die polyvinyl difluoride (PVDF)-Membranen erst kurz in Methanol, dann 5 min in ddH₂O und schließlich 10 min zusammen mit den SDS-Gelen im Transferpuffer (Tabelle 5) gewaschen. Danach wurde auf die Anodenplatte ein Fibrepad, ein Whatman Paper und oben auf die PVDF-Membran und das Gel gelegt. Auf die Kathodenplatte wurden ebenfalls ein Fibrepad und ein Whatman Paper gelegt und alles mit Transferpuffer durchnässt und luftblasenfrei zusammengepresst. Dieses sogenannte Sandwich wurde schließlich in der Blottingkammer, gefüllt mit Transferpuffer, 1-2 h bei 100 V und ununterbrochener Kühlung laufen gelassen.

Im Anschluss an das Blotten wurde der Proteintransfer vom Gel auf die PVDF-Membran mittels der Ponceau-Färbung überprüft und die Ponceau-Lösung vor

dem Blocken der unspezifischen Antikörperbindungsstellen wieder mit Waschpuffer (Tabelle 5) heraus gewaschen.

2.4.6. Antikörperschritte

Bevor der primäre Antikörper auf die Membran gegeben werden konnte, musste dafür gesorgt werden, dass alle unspezifischen Antikörperbindungsstellen besetzt waren, was durch eine einstündige Inkubation der PVDF-Membranen in Blockingpuffer (Tabelle 5) bei RT geschah. Danach konnte die Membran über Nacht mit dem entsprechenden primären Antikörper (Tabelle 7) bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert werden.

Am nächsten Tag wurden die überschüssigen primären Antikörper in mehreren gründlichen Waschschritten mit Waschpuffer (Tabelle 5) von der Membran entfernt und im Anschluss daran die Membran für zwei Stunden bei RT mit dem jeweiligen sekundären Antikörper (Tabelle 7) inkubiert. Auch nach diesem Schritt wurde die Membran wieder mehrfach gründlich mit Waschpuffer gewaschen um überschüssige Antikörper zu entfernen.

2.4.7. Signaldetektion

Alle verwendeten sekundären Antikörper waren mit HRP (Horse-Radish-Peroxidase) konjugiert und konnten somit mittels des ECL-Plus Detergenz (Tabelle 4) sichtbar gemacht werden.

Dazu wurden die Membranen, gemäß den Angaben des Herstellers, für 5 min bei RT mit dem Detergenz inkubiert und danach in Folie eingepackt und in einer Röntgenkassette arrangiert. Nach der Inkubation hatte man ungefähr 30 min Zeit für die Entwicklung, da die HRP langsam das Detergenz umsetzt und so ein Lichtsignal aussendet.

Dieses Lichtsignal wurde dazu genutzt, um in einer Dunkelkammer den Röntgenfilm zu exponieren, sodass sich dieser nach der Entwicklung mittels der Entwicklermaschine an den Licht exponierten Stellen dunkler gefärbt darstellt.

2.4.8. Membranstripping

Um im Anschluss an das Entwickeln noch weitere Proteine auf der gleichen Membran darstellen zu können, wurden die Membranen 1 h bei RT mit Strippingpuffer (Tabelle 5) inkubiert und so alle Antikörper wieder von der Membran gelöst. Danach musste die Membran einige Male mit Waschpuffer gewaschen werden und konnte schließlich wieder mit Blockingpuffer und im Anschluss den entsprechenden Antikörpern inkubiert werden.

2.4.9. Densitometrie

Zur Auswertung der Western Blots wurden die Filme eingescannt und die Schwärzung der Banden mittels Densitometrie gemessen. Diese Schwärzungen wurden danach gegen die Schwärzung des Referenzproteins (β -Actin), der Kontrolle und bei Phosphorylierungen weiterhin zur unphosphorylierten Proteinform normalisiert und so semiquantitativ die Proteinmenge bestimmt.

2.5. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ähnlich dem Western Blot handelt es sich bei dem ELISA um ein Antikörper basiertes Nachweissystem für Proteine, jedoch lässt sich hierbei mittels einer standardisierten Referenzprobe eine quantitative Aussage über die Menge eines einzelnen Proteins in einer Probe treffen.

2.5.1. Probenvorbereitung

Mit Hilfe des ELISAs wurden VEGF-Protein Konzentrationen im Zellkulturüberstand 72 h nach der Bestrahlung gemessen.

Dafür mussten die Zellkulturüberstände vor dem Gebrauch 5 min bei 248 g abzentrifugiert werden, um verbliebene Zellen als Pellet am Boden verwerfen zu können; außerdem wurden die Proben 1:10 mit ddH₂O verdünnt, damit die VEGF-Konzentrationen im Messbereich des Kits lagen.

2.5.2. VEGF-Messung

Die Proteinmessung von VEGF wurde mit dem Quantikine Human VEGF-Kit (Tabelle 4) von R&D Systems nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Dazu musste zuerst eine Verdünnungsreihe an VEGF₁₆₅-Standards als Referenz hergestellt werden. Dann wurden in jedes Well, der im Kit enthaltenen und mit monoklonalem VEGF-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatten, 50 µl des Proteinpuffers aus dem Kit gegeben. Außerdem wurden sowohl von den Standards als auch von den Proben 200 µl als Duplett dazu pipettiert. Im Anschluss wurde die Platte für 2 h bei RT inkubiert, dreimal mit 400 µl des im Kit enthaltenen Waschpuffers gewaschen und auf Papier Tücher ausgeklopft. Danach wurde jedem Well 200 µl des im Kit enthaltenen VEGF-Antikörper-Meerrettichperoxidase Konjugats zugefügt, die Platte erneut für 2 h bei RT inkubiert und daraufhin die Waschschrte wiederholt. Um schließlich einen Farbumschlag in den Wells zu verursachen, wurde in jedes Well noch einmal 200 µl des im Kit enthaltenen Substrates pipettiert, die Platte für 20 min im Dunkeln inkubiert und die Reaktion mit der Stopp-Lösung abgebrochen.

Danach musste innerhalb einer halben Stunde die Absorption bei 450 nm gemessen und so im Vergleich mit den Standards die VEGF-Konzentration der Proben in pg/ml bestimmt werden.

2.5.3. Auswertung

Um die Gesamtmenge an VEGF in den Zellkulturüberständen zu ermitteln, wurden die gemessenen Werte zu den Gesamtprotein Konzentrationen und zur Kontrolle normalisiert

2.6. MicroArray-Analyse

Während der Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, wurde von unserer Arbeitsgruppe eine MicroArray-Analyse in Auftrag gegeben, die mehrere hundert Gene auf ihre Aktivität nach Bestrahlung untersuchte. Ein Auszug dieser MicroArray-Analyse wurde auch in dieser Arbeit verwendet. Das Vorgehen hierfür kann in Subtil et al. 2014 nachgelesen werden.

2.7. Statistische Auswertung

Alle im Zusammenhang mit dieser Arbeit gewonnenen Daten wurden mit Excel 2010 aufgearbeitet, mittels GraphPad Prism 5 ausgewertet und graphisch dargestellt. Dabei wurden die Einzelwerte als sogenannter Scatter-Dot-Plot dargestellt, sodass jedes x einem, in einem unabhängigen Experiment gemessenen, Wert entspricht. Außerdem wurden der geometrische Mittelwert und die 95% Konfidenzintervalle dargestellt. Dabei wurde für jedes Experiment darauf geachtet, dass mindestens 5 unabhängig voneinander entstandene Proben ausgewertet werden konnten ($n \geq 5$).

Statistische Signifikanzen wurden mit ungepaarten t-Tests ermittelt und auszugsweise in den Abbildungen mit dem dazugehörigen p -Wert gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. HIF-1 α RNA-Ebene

Im Folgenden wird gezeigt, wie die beobachteten Zelllinien (H1299 & A549) auf die HIF-1 α -Inhibition mittels siRNA auf HIF-1 α -mRNA Ebene reagieren. Dazu wurden Proben gemäß dem Versuchsprotokoll (s. 2.2.6.) generiert und anschließend in der quantitativen Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) im Hinblick auf ihre HIF-1 α mRNA-Expression untersucht. Für die Auswertung wurden alle Δ C_T-Werte der mit siHIF-1 α behandelten Proben mit denen der mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten Proben der gleichen Gruppe in Relation gesetzt.

Sowohl A549- als auch H1299-Zellen zeigten nach der HIF-1 α -Inhibition mittels siRNA eine deutlich verminderte HIF-1 α mRNA-Expression (Abbildung 9). Dies galt sowohl für unbestrahlte, als auch für bestrahlte Proben, wobei keine Unterschiede zwischen Photonen- und Schwerionenstrahlung erkenntlich waren. Im Mittel war in allen siHIF-1 α transfizierten Gruppen ungefähr eine 4-fach niedrigere HIF-1 α mRNA-Expression, als in den mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten Gruppen, sichtbar (alle $p < 0.001$).

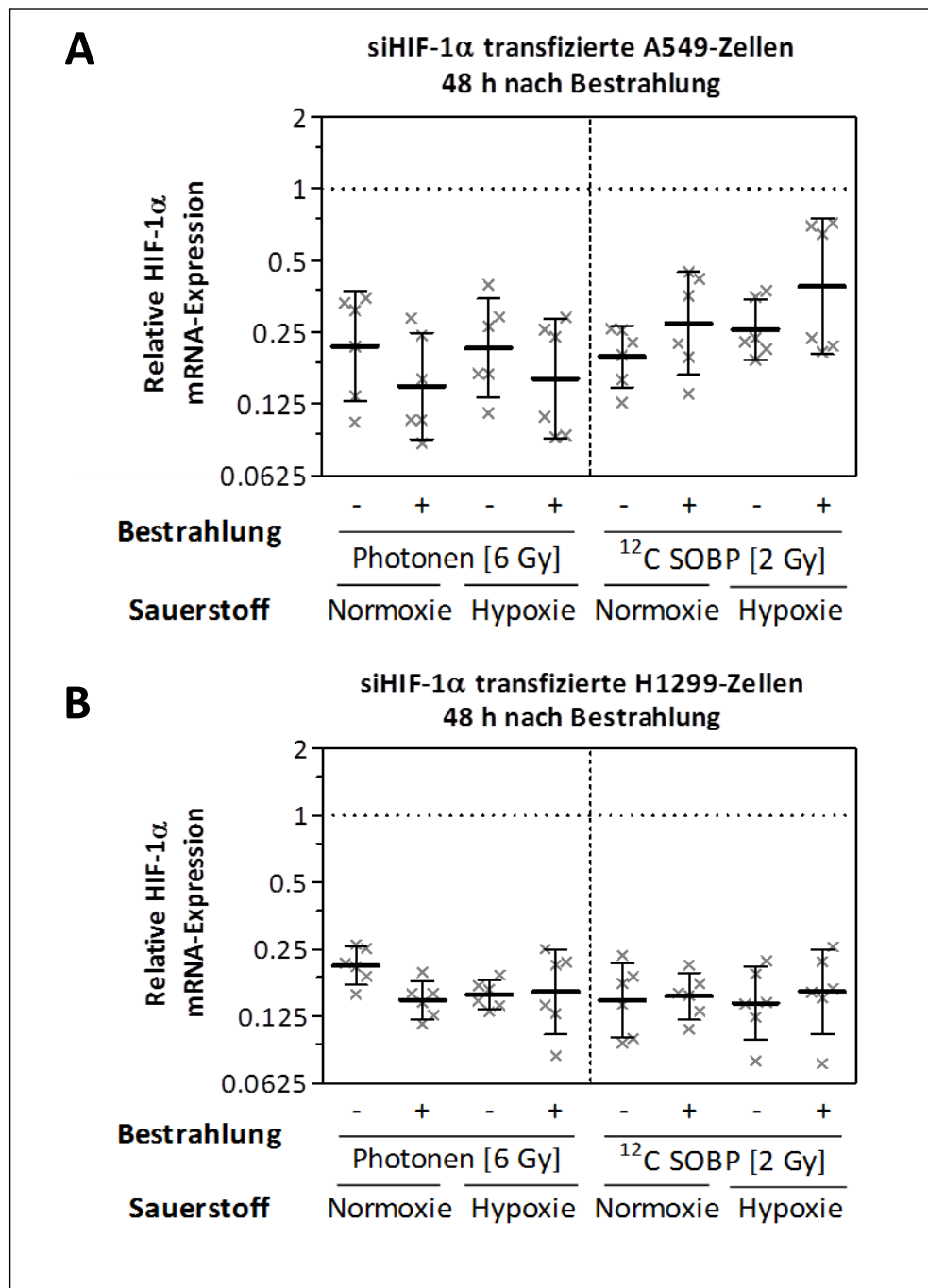


Abbildung 9: Relative HIF-1 α mRNA-Expression nach Transfektion mit siHIF-1 α

Die relative HIF-1 α mRNA-Expression war in siHIF-1 α transfizierten Proben sowohl in A549-Zellen (A), als auch in H1299-Zellen (B) unabhängig von der Bestrahlung im Mittel um den Faktor 4 kleiner, als in mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten Proben. Die Werte der mit siHIF-1 α behandelten Proben wurden jeweils mit den Werten der dazugehörigen mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten Proben in Relation gesetzt und verglichen. Dieser Vergleich ergab in allen Gruppen p -Werte <0.001 ($n \geq 5$). Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte (fettgedruckter Querbalken) und die 95%-Konfidenzintervalle.

3.2. HIF-1 α Proteinebene

Dieser Abschnitt zeigt, wie sich die HIF-1 α Proteinexpression durch die, gemäß dem Versuchsprotokoll (s. 2.2.6.) durchgeführten, Behandlungen verändert. Dazu wurden Proben mittels Western Blot im Hinblick auf ihre HIF-1 α Proteinexpression untersucht. Als *Kontrolle* dienen die Proben, die in Normoxie inkubiert, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelt und nicht bestrahlt wurden. Die dargestellten Positivkontrollen (pos. Kontr.) repräsentieren zusätzlich Proben, welche ohne sonstige Behandlung 24 h nach Hypoxieinkubation gestoppt wurden.

Die HIF-1 α Proteinexpression war unter **Normoxie** in den mit **Photonen** bestrahlten Proben beider Zelllinien um das 1.5-fache (A549 MW: 1.48, KI: 1.10–1.99, $p=0.031$; H1299 MW: 1.54, KI: 1.11–2.12, $p=0.034$) (Abbildung 10 & Abbildung 11) höher als die der Kontrollen. Diese vermehrte Expression konnte in den mit **Kohlenstoffionen** bestrahlten Proben nicht beobachtet werden. In den **HIF-1 α inhibierten** Proben war die HIF-1 α Proteinexpression beider Zelllinien in Normoxie unabhängig von der Bestrahlung im Mittel um den Faktor 4 geringer als die der Kontrollen (alle $p<0.005$).

Die HIF-1 α Proteinexpression war in den mit **Hypoxie** inkubierten Proben beider Zelllinien deutlich erhöht. Die A549-Zellen wiesen 3.8-fach (MW: 3.75, KI: 2.17–6.48, $p=0.021$) (Abbildung 10) und die H1299-Zellen 3.5-fach (MW: 3.49, KI: 2.18–5.58, $p=0.006$) (Abbildung 11) erhöhte Werte im Vergleich zu den Kontrollen auf. Diese vermehrte Expression zeigte sich auch in den Positivkontrollen (pos. Kontr.) (A549 MW: 3.57, KI: 3.17–4.02, $p<0.001$; H1299 MW: 3.44, KI: 1.98–5.97, $p=0.017$). Die unter Hypoxie mit **Photonen** bestrahlten Proben zeigten eine erhöhte HIF-1 α Proteinexpression. In A549-Zellen war sie, im Vergleich zu den in Hypoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben, 1.4-fach (0 Gy MW: 3.75, KI: 2.17–6.48; 6 Gy MW: 5.32, KI: 3.24–8.72; $p=0.224$) (Abbildung 10) und in H1299-Zellen 1.3-fach (0 Gy MW: 3.49, KI: 2.18–5.58; 6 Gy MW: 4.39, KI: 2.79–6.70; $p=0.245$) (Abbildung 11) erhöht. Nach Hypoxie und **Kohlenstoffionenbestrahlung** war auch hier in beiden Zelllinien kein Unterschied der HIF-1 α Proteinexpression nachweisbar. In den

HIF-1 α inhibierten Proben beider Zelllinien war nach Hypoxie die HIF-1 α Proteinexpression unabhängig von der Bestrahlung um den Faktor 6 geringer als die der in Hypoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) und unbestrahlten Proben (alle $p < 0.005$).

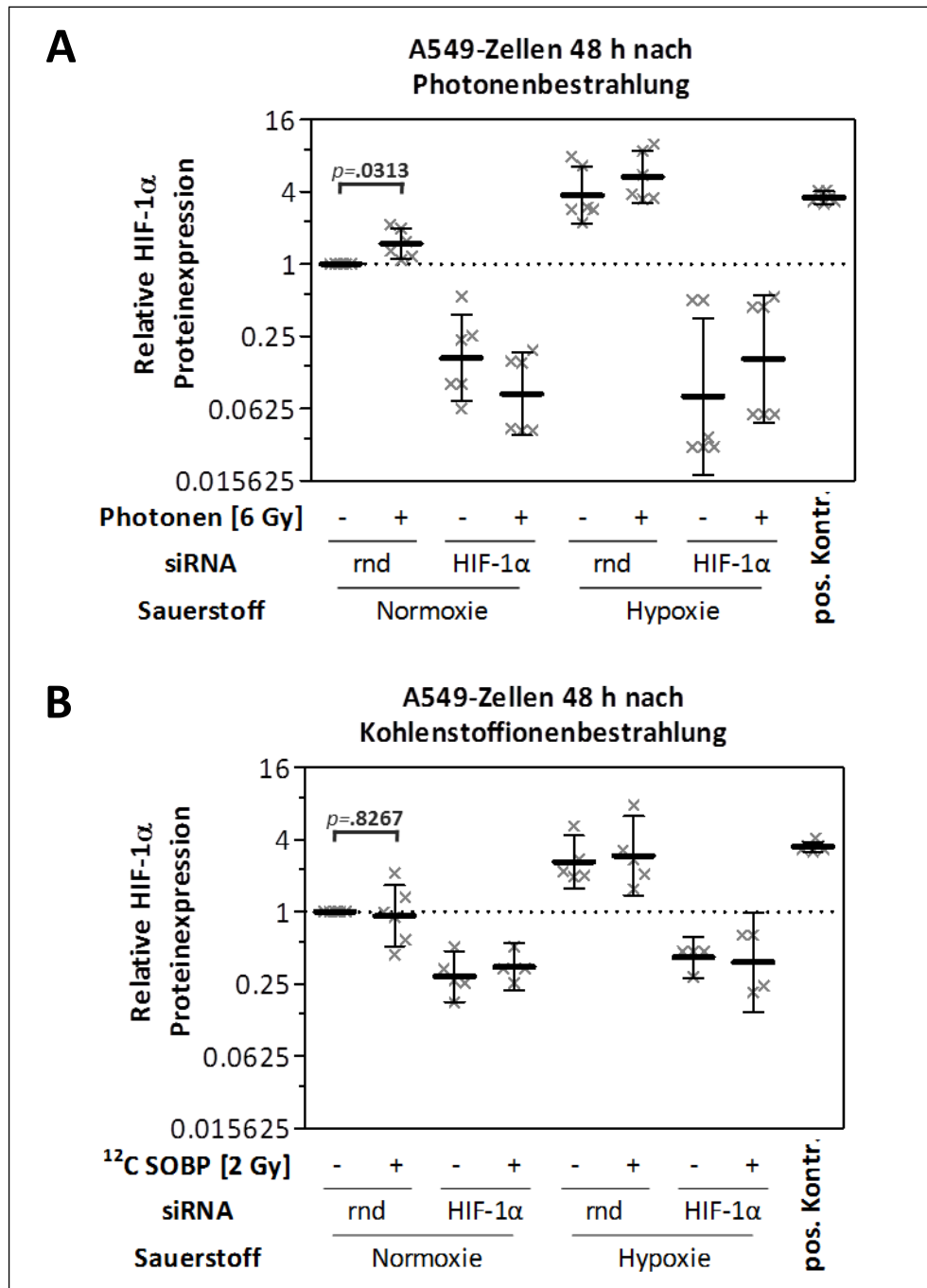


Abbildung 10: Relative HIF-1 α Proteinexpression in A549-Zellen

Die relative HIF-1 α Proteinexpression war 48 h nach Photonenbestrahlung (A), im Gegensatz zur Kohlenstoffionenbestrahlung [^{12}C SOBP] (B), in normoxischen A549-Zellen um das 1.48(1.10...1.99)-fache erhöht. Alle Werte wurden zu den in Normoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben in Relation gesetzt. Die Positivkontrollen (pos. Kontr.) repräsentieren A549-Zellen, welche ohne sonstige Behandlung 24 h nach Hypoxieinkubation gestoppt wurden ($n \geq 5$). Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte (fettgedruckter Querbalken) und die 95%-Konfidenzintervalle. Ausgewählte Effekte beider Bestrahlungsqualitäten sind zusätzlich mit ihren p -Werten gekennzeichnet.

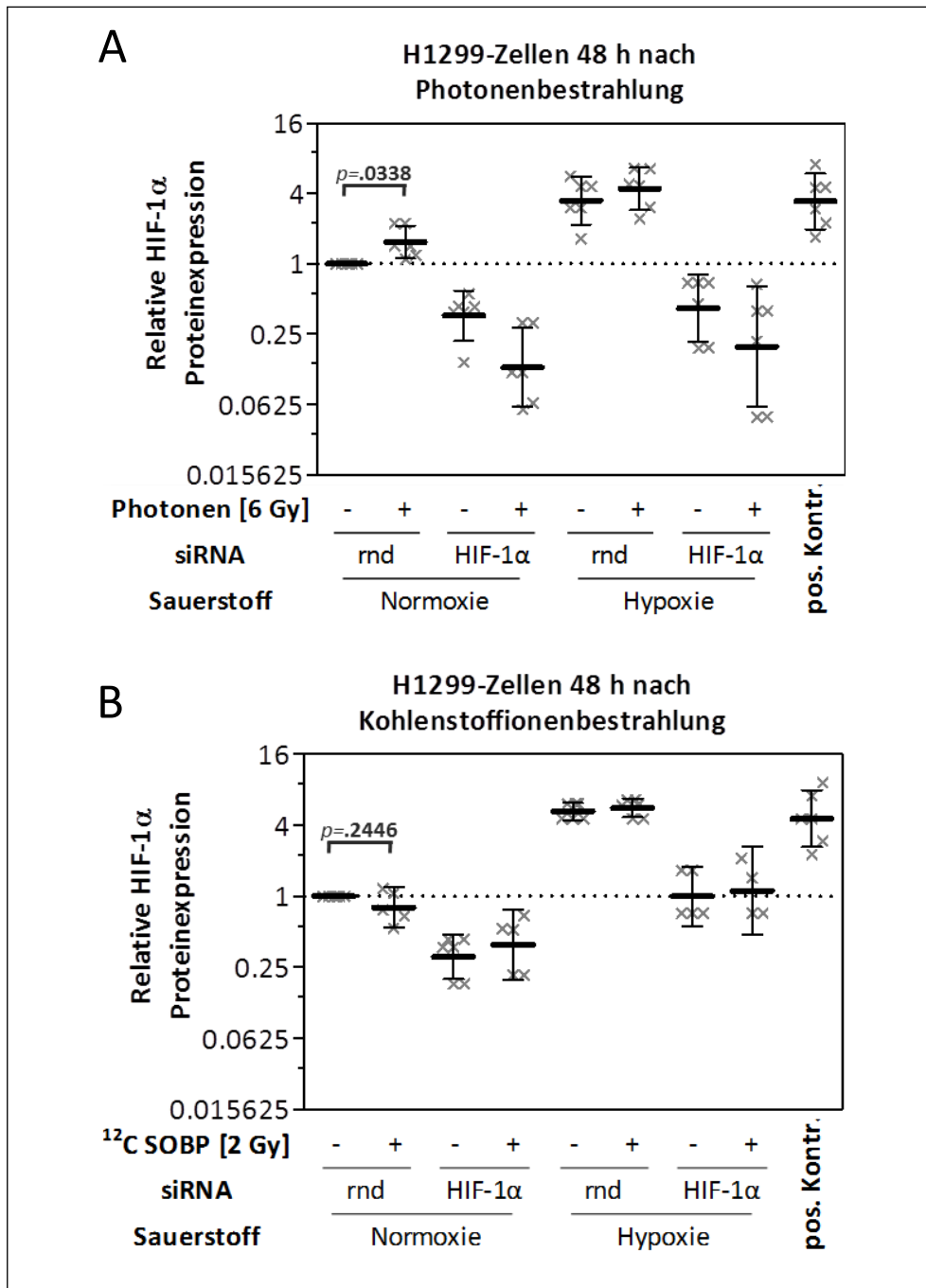


Abbildung 11: Relative HIF-1α Proteinexpression in H1299-Zellen

Die relative HIF-1α Proteinexpression war 48 h nach Photonenbestrahlung (A), im Gegensatz zur Kohlenstoffionenbestrahlung [^{12}C SOBP] (B), in normoxischen H1299-Zellen um das 1.54(1.11...2.12)-fache erhöht. Alle Werte wurden zu den in Normoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben in Relation gesetzt. Die Positivkontrollen (pos. Kontr.) repräsentieren A549-Zellen, welche ohne sonstige Behandlung 24 h nach Hypoxieinkubation gestoppt wurden ($n \geq 5$). Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte (fettgedruckter Querbalken) und die 95%-Konfidenzintervalle. Ausgewählte Effekte beider Bestrahlungsqualitäten sind zusätzlich mit ihren p -Werten gekennzeichnet.

3.3. HIF-1 α abhängige Zielgene (RNA-Ebene)

Die folgenden Abschnitte zeigen, wie sich die mRNA-Expressionen, der in dieser Arbeit untersuchten HIF-1 abhängigen Zielgene, durch die verschiedenen Behandlungen verändern. Dazu wurden Proben gemäß dem Versuchsprotokoll (s. 2.2.6.) generiert und im Anschluss mittels qRT-PCR im Hinblick auf die verschiedenen mRNA-Expressionen untersucht. Für die Auswertung wurden alle Δ ct-Werte zu den Δ ct-Werten der Proben, die in Normoxie inkubiert, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelt und nicht bestrahlt wurden (=Kontrollgruppe), in Relation gesetzt und so die relativen mRNA-Expressionen ($\Delta\Delta$ ct) ermittelt.

3.3.1. Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A)

Das erste in dieser Arbeit untersuchte HIF-abhängige Zielgen war VEGF-A, als Indikator für die Angiogenese.

Die VEGF-A mRNA-Expression war unter **Normoxie** in den mit **Photonen** bestrahlten Proben in A549-Zellen um das 1.6-fache (MW: 1.66, KI: 1.38-1.99, $p=0.036$) (Abbildung 12) und in H1299-Zellen um das 1.2-fache (MW: 1.18, KI: 0.95-1.45, $p=0.138$) (Abbildung 13) höher als die der Kontrollen. Diese vermehrte Expression konnte in den mit **Kohlenstoffionen** bestrahlten Proben nicht beobachtet werden. In A549-Zellen war die VEGF-A mRNA-Expression in den **HIF-1 α inhibierten** Proben nur wenig geringer, als in den mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten Proben (Abbildung 12). In den H1299-Zellen war die VEGF-A mRNA-Expression in Normoxie unabhängig von der Bestrahlung um den Faktor 4 geringer als die der Kontrollen (alle $p<0.005$) (Abbildung 13).

Weiterhin war die VEGF-A mRNA-Expression in den mit **Hypoxie** inkubierten Proben beider Zelllinien deutlich erhöht. Die A549-Zellen wiesen 5.4-fach (MW: 5.38, KI: 2.82-10.28, $p=0.019$) (Abbildung 12) und die H1299-Zellen 2.1-fache (MW: 2.14, KI: 1.58-2.89, $p=0.004$) (Abbildung 13) erhöhte Werte im Vergleich zu den Kontrollen auf. Die unter Hypoxie mit **Photonen** bestrahlten Proben zeigten eine erhöhte VEGF-A mRNA-Expression. In A549-Zellen war sie im Vergleich zu den in Hypoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben 2.8-fach (0 Gy MW: 5.38, KI: 2.82-10.28; 6 Gy MW: 15.19,

KI: 8.73-26.42; $p=0.027$) (Abbildung 12) und in H1299-Zellen 1.4-fach (0 Gy MW: 2.14, KI: 1.58-2.89; 6 Gy MW: 3.07, KI: 2.02–4.67; $p=0.169$) (Abbildung 13) erhöht. Nach Hypoxie und **Kohlenstoffionenbestrahlung** war in beiden Zelllinien kein Unterschied der VEGF-A mRNA-Expression nachweisbar. In den **HIF-1 α inhibierten** Proben der H1299-Zellen war nach Hypoxie die VEGF-A mRNA-Expression unabhängig von der Bestrahlung um den Faktor 4 geringer als die der in Hypoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) und unbestrahlten Proben (alle $p<0.05$). Diese verminderte Expression war in den A549-Zellen so nicht zu beobachten.

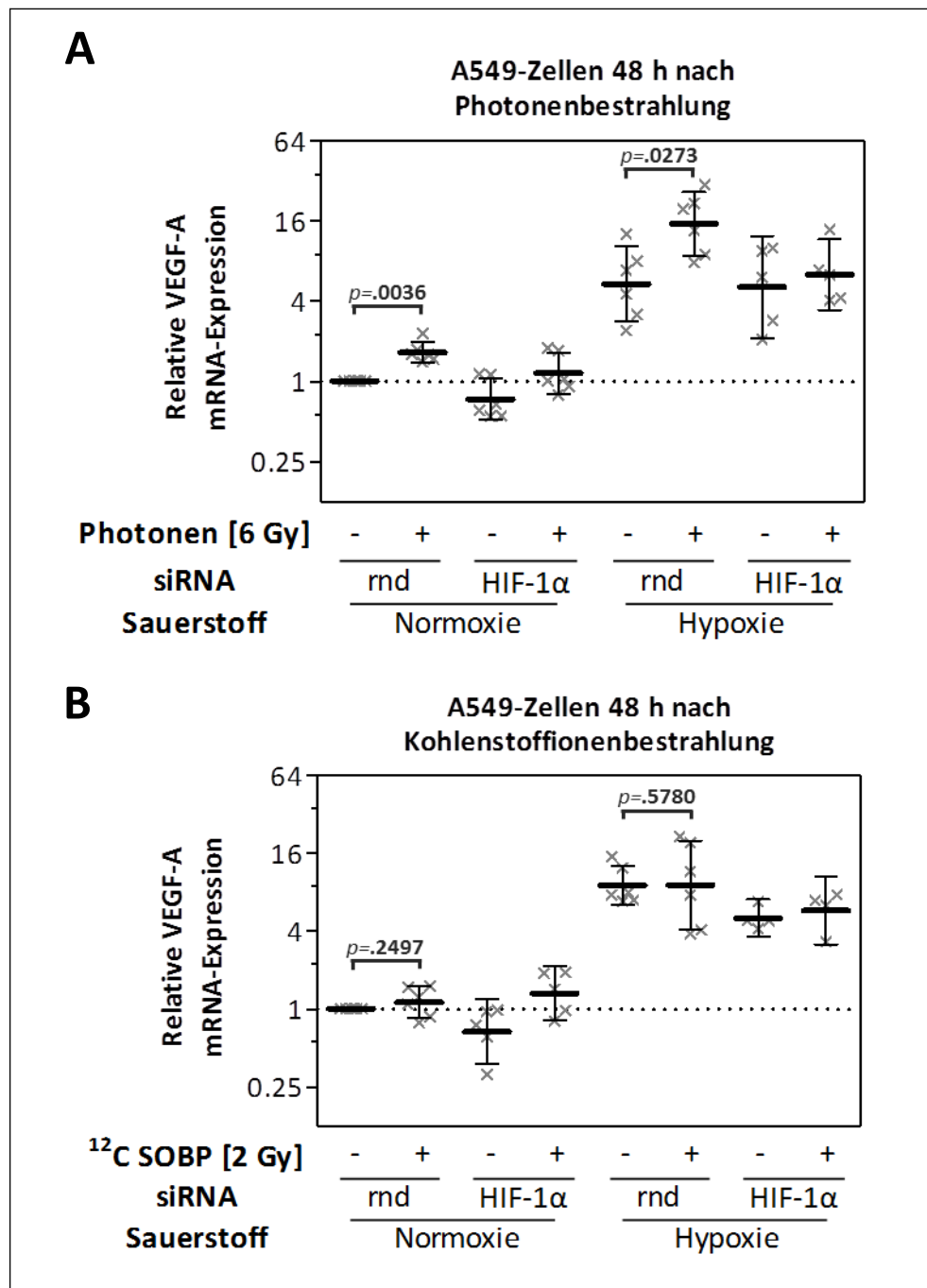


Abbildung 12: Relative VEGF-A mRNA-Expression in A549-Zellen

Die relative VEGF-A mRNA-Expression war 48 h nach Photonenbestrahlung (A), im Gegensatz zur Kohlenstoffionenbestrahlung [^{12}C SOBP] (B), in normoxischen A549-Zellen um das 1.66(1.38...1.99)-fache erhöht. Das Gleiche gilt für die mit Hypoxie inkubierten Zellen, hier ist die VEGF-A mRNA-Expression in den mit Photonen bestrahlten Proben 2.82(2.57...3.10)-fach erhöht, wobei auch diese vermehrte Expression nach Kohlenstoffionenbestrahlung nicht sichtbar wird. Alle Werte wurden zu den in Normoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben in Relation gesetzt ($n \geq 5$). Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte (fettgedruckter Querbalken) und die 95%-Konfidenzintervalle. Ausgewählte Effekte beider Bestrahlungsqualitäten sind zusätzlich mit ihren p -Werten gekennzeichnet.

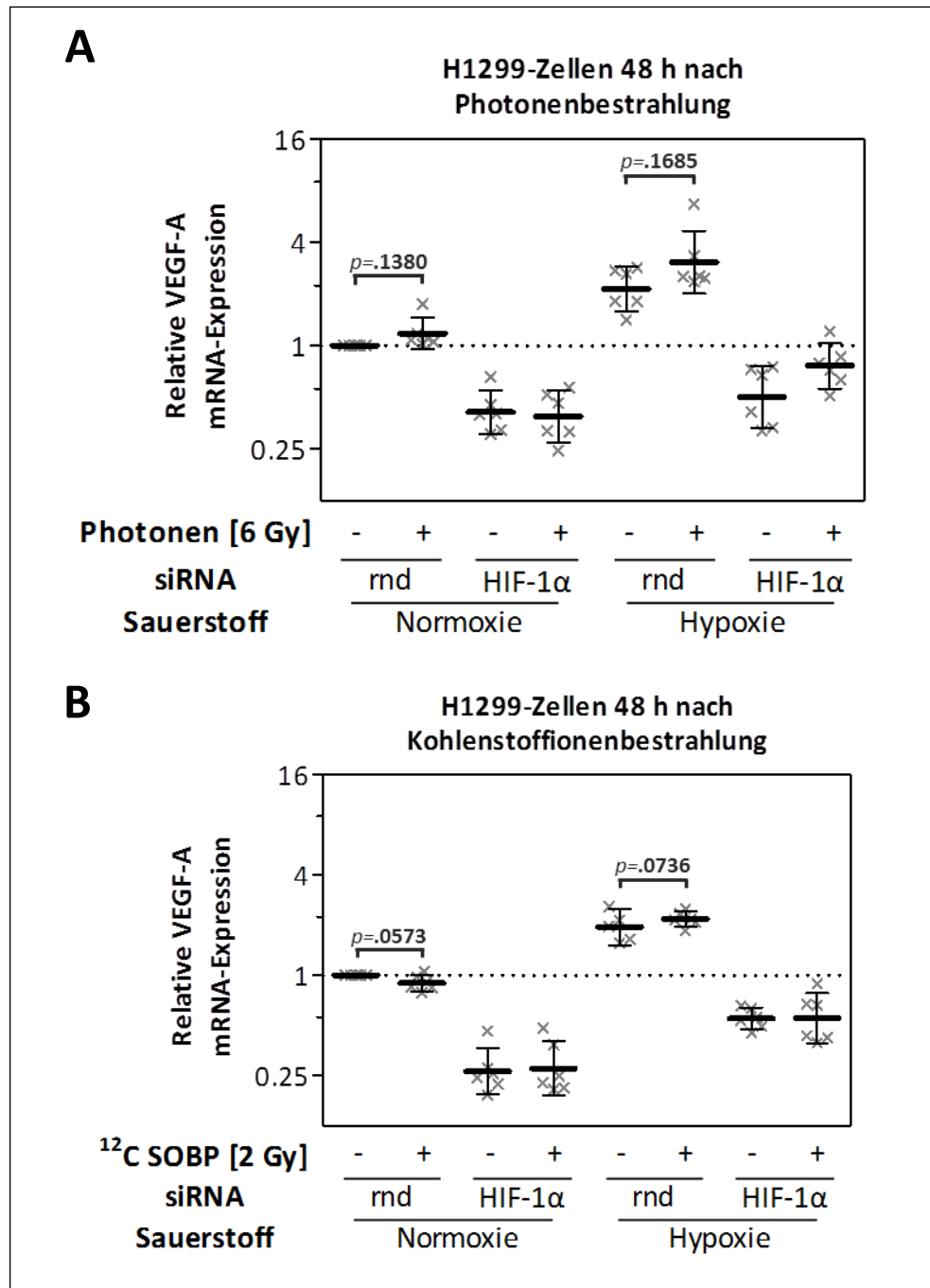


Abbildung 13: Relative VEGF-A mRNA-Expression in H1299-Zellen

Die relative VEGF-A mRNA-Expression war 48 h nach Photonenbestrahlung (A), im Gegensatz zur Kohlenstoffionenbestrahlung [¹²C SOBP] (B), in normoxischen A549-Zellen um das 1.17(0.95...1.45)-fache erhöht. Alle Werte wurden zu den in Normoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben in Relation gesetzt (n≥5). Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte (fettgedruckter Querbalken) und die 95%-Konfidenzintervalle. Ausgewählte Effekte beider Bestrahlungsqualitäten sind zusätzlich mit ihren *p*-Werten gekennzeichnet.

3.3.2. Glukose-Transporter-1 (*Glut-1*)

Als Indikator für den Glukosemetabolismus wurde das HIF-abhängige Zielgen GLUT-1 untersucht.

Die GLUT-1 mRNA-Expression war unter **Normoxie** in den mit **Photonen** bestrahlten Proben in A549-Zellen um das 2.1-fache (MW: 2.09, KI: 1.60–2.74, $p=0.034$) (Abbildung 14) und in H1299-Zellen um das 1.3-fache (MW: 1.31, KI: 1.02-1.69, $p=0.072$) (Abbildung 15) höher als die der Kontrollen. Diese vermehrte Expression konnte in den mit **Kohlenstoffionen** bestrahlten Proben nicht beobachtet werden. In den **HIF-1 α inhibierten** Proben der A549-Zellen war kein Unterschied der GLUT-1 mRNA-Expression in den HIF-1 α inhibierten Proben im Vergleich zu den Kontrollen zu erkennen (Abbildung 14) und in H1299-Zellen ist die GLUT-1 mRNA-Expression in Normoxie unabhängig von der Bestrahlung um den Faktor 1.5 höher als die der Kontrollen (Abbildung 15).

Weiterhin war die GLUT-1 mRNA-Expression in den mit **Hypoxie** inkubierten Proben beider Zelllinien deutlich erhöht. Die A549-Zellen wiesen 7.5-fach (MW: 7.54, KI: 5.26-10.80, $p<0.001$) (Abbildung 14) und die H1299-Zellen 2.9-fache (MW: 2.93, KI: 2.22-3.88; $p<0.001$) (Abbildung 15) erhöhte Werte im Vergleich zu den Kontrollen auf. Auch die unter Hypoxie mit **Photonen** bestrahlten Proben zeigten eine erhöhte VEGF-A mRNA-Expression. In A549-Zellen war sie im Vergleich zu den in Hypoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben 2.6-fach (0 Gy MW: 7.54, KI: 5.26-10.80; 6 Gy MW: 19.43, KI: 11.01-34.29; $p=0.027$) (Abbildung 14) und in H1299-Zellen 2.3-fach (0 Gy MW: 2.93, KI: 2.22-3.87; 6 Gy MW: 6.67, KI: 4.67–9.53; $p=0.006$) (Abbildung 15) erhöht. Nach Hypoxie und **Kohlenstoffionenbestrahlung** war auch hier in beiden Zelllinien kein Unterschied der GLUT-1 mRNA-Expression nachweisbar. In den **HIF-1 α inhibierten** Proben der A549-Zellen war nach Hypoxie die GLUT-1 mRNA-Expression unabhängig von der Bestrahlung um den Faktor 2 geringer als die der in Hypoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) und unbestrahlten Proben (alle $p<0.05$). Diese verminderte Expression war in den H1299-Zellen nicht zu beobachten.

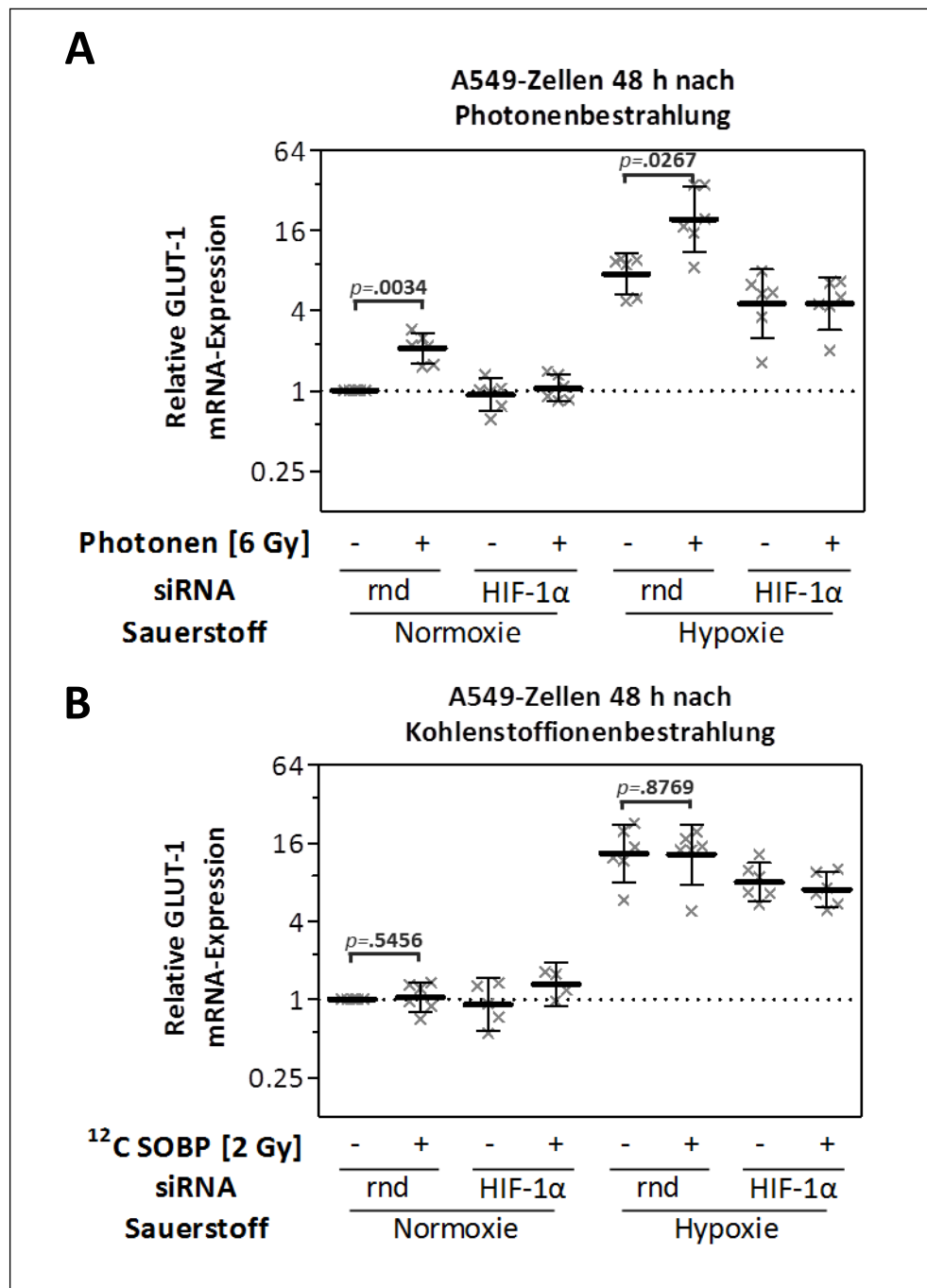


Abbildung 14: Relative GLUT-1 mRNA-Expression in A549-Zellen

Die relative GLUT-1 mRNA-Expression war 48 h nach Photonenbestrahlung (A), im Gegensatz zur Kohlenstoffionenbestrahlung [^{12}C SOBP] (B), in normoxischen A549-Zellen um das 2.09(1.60...2.74)-fache erhöht. Das Gleiche gilt für die mit Hypoxie inkubierten Zellen, hier ist die GLUT-1 mRNA-Expression in den mit Photonen bestrahlten Proben 2.58(2.09...3.18)-fach erhöht, wobei auch diese vermehrte Expression nach Kohlenstoffionenbestrahlung nicht sichtbar wird. Alle Werte wurden zu den in Normoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben in Relation gesetzt ($n \geq 5$). Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte (fettgedruckter Querbalken) und die 95%-Konfidenzintervalle. Ausgewählte Effekte beider Bestrahlungsqualitäten sind zusätzlich mit ihren p -Werten gekennzeichnet.

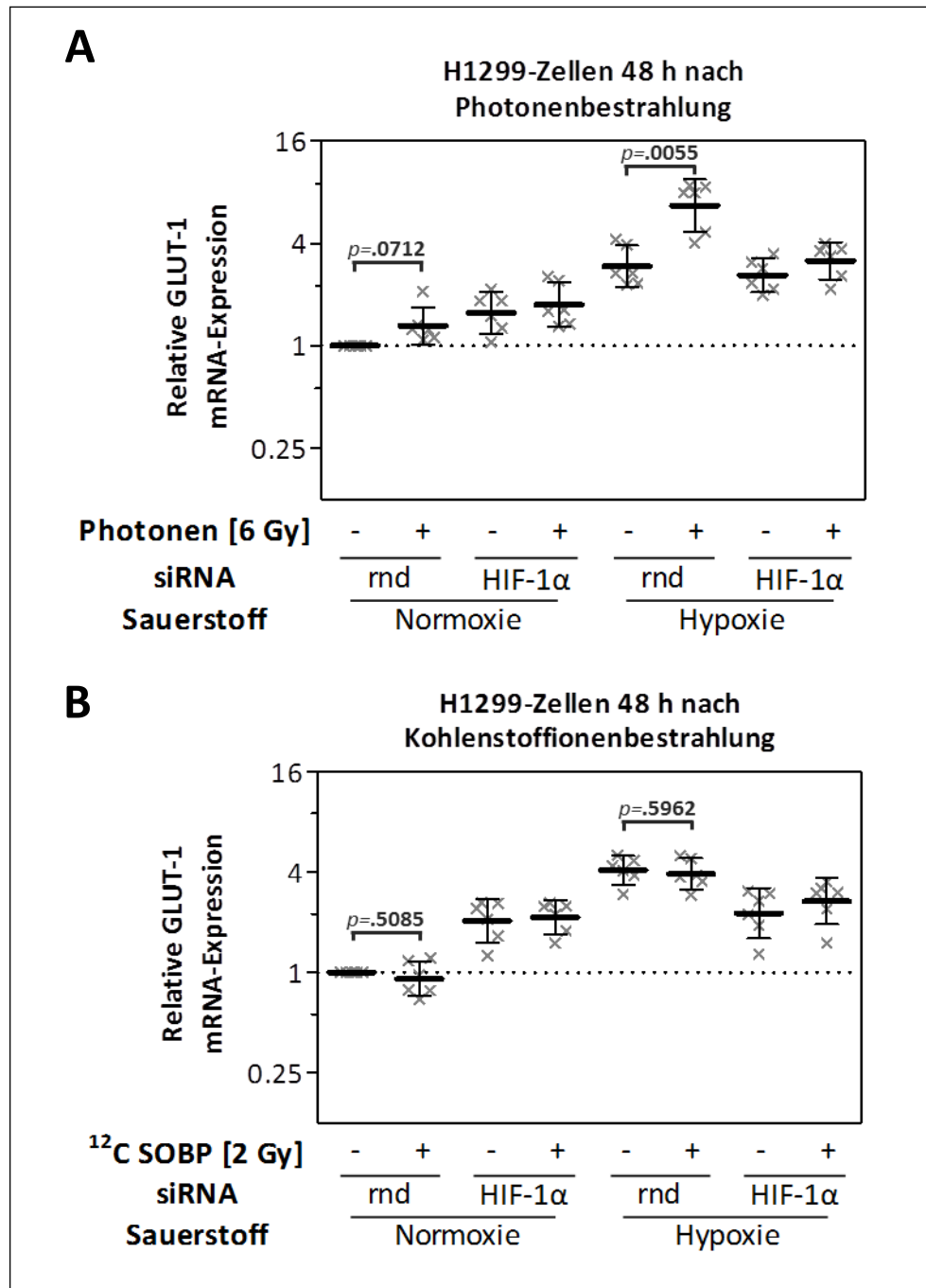


Abbildung 15: Relative GLUT-1 mRNA-Expression in H1299-Zellen

Die relative GLUT-1 mRNA-Expression war 48 h nach Photonenbestrahlung (A), im Gegensatz zur Kohlenstoffionenbestrahlung [^{12}C SOBP] (B), in normoxischen H1299-Zellen um das 1.31(1.02...1.69)-fache erhöht. Das Gleiche gilt für die mit Hypoxie inkubierten Zellen, hier ist die GLUT-1 mRNA-Expression in den mit Photonen bestrahlten Proben 2.28(2.11...2.46)-fach erhöht, wobei auch diese vermehrte Expression nach Kohlenstoffionenbestrahlung nicht sichtbar wird. Alle Werte wurden zu den in Normoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben in Relation gesetzt ($n \geq 5$). Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte (fettgedruckter Querbalken) und die 95%-Konfidenzintervalle. Ausgewählte Effekte beider Bestrahlungsqualitäten sind zusätzlich mit ihren p -Werten gekennzeichnet.

3.3.3. Lactatdehydrogenase-A (LDH-A)

Als Indikator für den Tumormetabolismus wurde das HIF-abhängige Zielgen LDH-A untersucht.

Die LDH-A mRNA-Expression war unter **Normoxie** in den mit **Photonen** bestrahlten Proben in A549-Zellen um das 1.6-fache (MW: 1.61, KI: 1.36–1.89, $p=0.002$) (Abbildung 16) und in H1299-Zellen um das 1.4-fache (MW: 1.40, KI: 1.16–1.69, $p=0.01$) (Abbildung 17) höher als die der Kontrollen. Diese vermehrte Expression konnte in den mit **Kohlenstoffionen** bestrahlten Proben nicht beobachtet werden. In den **HIF-1 α inhibierten** und nicht bestrahlten Proben beider Zelllinien war die LDH-A mRNA-Expression um den Faktor 2 geringer als die der Kontrollen (alle $p<0.05$) (Abbildung 16 & Abbildung 17). Dieser Effekt konnte in bestrahlten Proben nicht mehr gezeigt werden (Abbildung 16 & Abbildung 17).

Weiterhin war die LDH-A mRNA-Expression in den mit **Hypoxie** inkubierten Proben beider Zelllinien deutlich erhöht. Die A549-Zellen wiesen 3.2-fach (MW: 3.21, KI: 2.84–3.62, $p<0.001$) (Abbildung 16) und die H1299-Zellen 3.7-fache (MW: 3.72, KI: 2.40–5.75; $p=0.006$) (Abbildung 17) erhöhte Werte im Vergleich zu den Kontrollen auf. Auch die unter Hypoxie mit **Photonen** bestrahlten Proben zeigten eine erhöhte LDH-A mRNA-Expression. In A549-Zellen war sie im Vergleich zu den in Hypoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben 1.5-fach (0 Gy MW: 3.21, KI: 2.84–3.62; 6 Gy MW: 4.48, KI: 3.85–5.22; $p=0.005$) (Abbildung 16) und in H1299-Zellen 1.7-fach (0 Gy MW: 3.72, KI: 2.40–5.75; 6 Gy MW: 6.30, KI: 4.68–8.49; $p=0.02$) (Abbildung 17) erhöht. Nach Hypoxieinkubation und **Kohlenstoffionenbestrahlung** war in beiden Zelllinien kein Unterschied der LDH-A mRNA-Expression nachweisbar. In den **HIF-1 α inhibierten** der H1299-Zellen war die LDH-A mRNA-Expression nach Hypoxie unabhängig von der Bestrahlungsqualität um den Faktor 4 geringer als die der Kontrollen (alle $p<0.05$) (Abbildung 17). Dieser Effekt konnte in den A549-Zellen nur teilweise beobachtet werden (Abbildung 16).

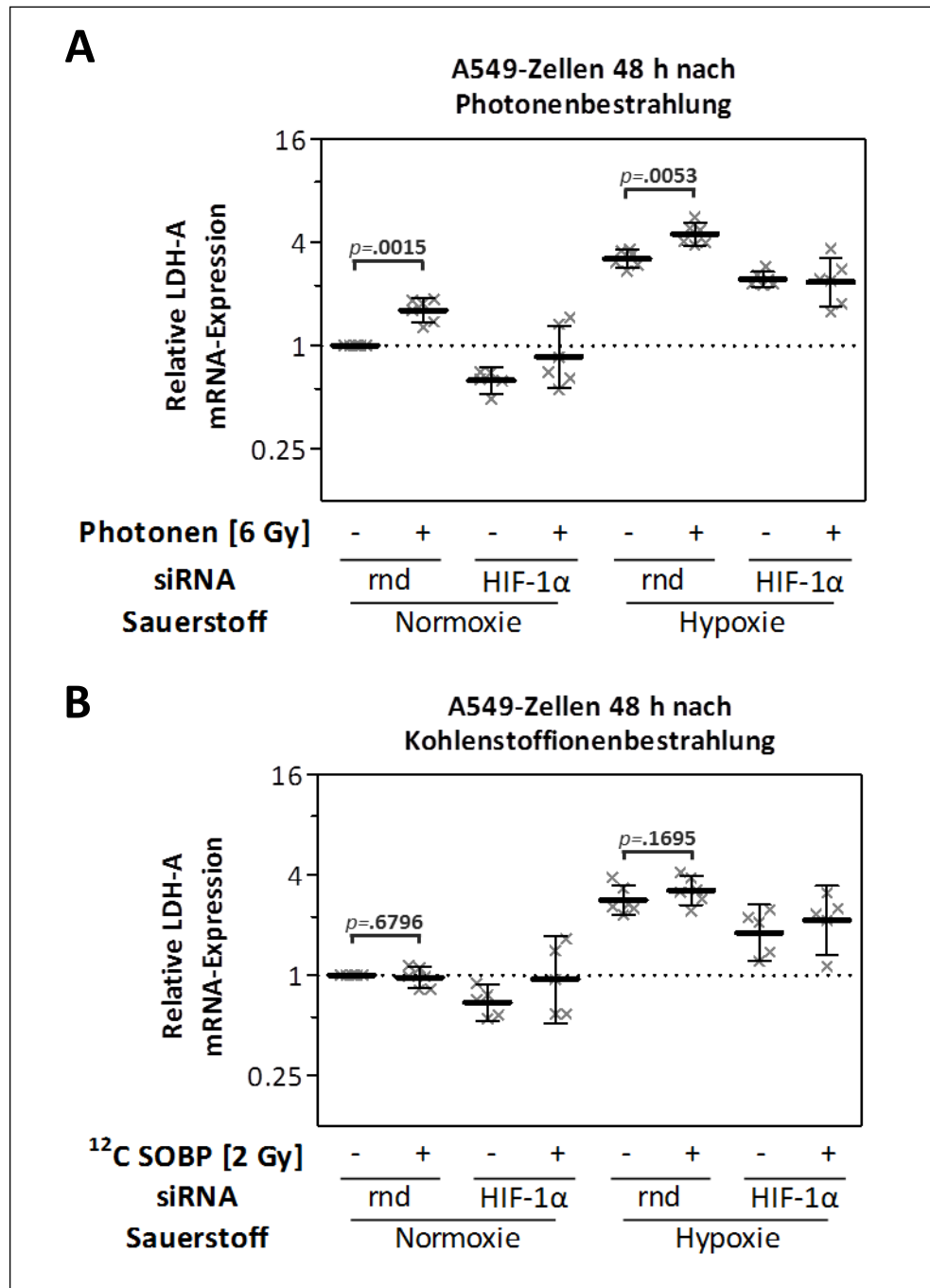
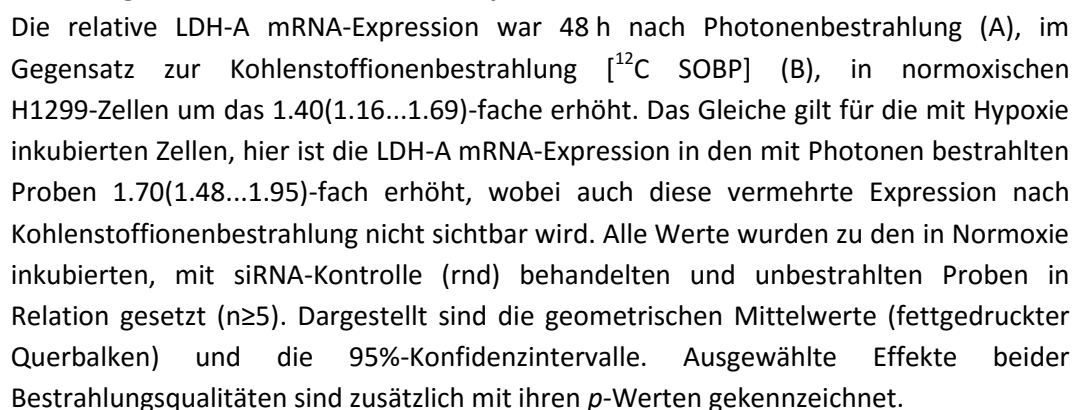


Abbildung 16: Relative LDH-A mRNA-Expression in A549-Zellen

Die relative LDH-A mRNA-Expression war 48 h nach Photonenbestrahlung (A), im Gegensatz zur Kohlenstoffionenbestrahlung [^{12}C SOBP] (B), in normoxischen A549-Zellen um das 1.61(1.36...1.90)-fache erhöht. Das Gleiche gilt für die mit Hypoxie inkubierten Zellen, hier ist die LDH-A mRNA-Expression in den mit Photonen bestrahlten Proben 1.40(1.35...1.44)-fach erhöht, wobei auch diese vermehrte Expression nach Kohlenstoffionenbestrahlung nicht sichtbar wird. Alle Werte wurden zu den in Normoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben in Relation gesetzt ($n \geq 5$). Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte (fettgedruckter Querbalken) und die 95%-Konfidenzintervalle. Ausgewählte Effekte beider Bestrahlungsqualitäten sind zusätzlich mit ihren p -Werten gekennzeichnet.



3.3.4. Pyruvatdehydrogenase-Kinase-1 (PDK-1)

Als Indikator für den Tumormetabolismus wurde das HIF-abhängige Zielgen PDK-1 untersucht.

Die PDK-1 mRNA-Expression war unter **Normoxie** in den mit **Photonen** bestrahlten Proben in A549-Zellen um das 2.0-fache (MW: 1.97, KI: 1.44–2.67, $p=0.009$) (Abbildung 18) und in H1299-Zellen um das 1.2-fache (MW: 1.21, KI: 0.93–1.58, $p=0.125$) (Abbildung 19) höher als die der Kontrollen. Diese vermehrte Expression konnte in den mit **Kohlenstoffionen** bestrahlten Proben nicht beobachtet werden. In den **HIF-1 α inhibierten** Proben der A549-Zellen war kein Unterschied der PDK-1 mRNA-Expression in den HIF-1 α inhibierten Proben im Vergleich zu den Kontrollen zu erkennen (Abbildung 18). In H1299-Zellen war die PDK-1 mRNA-Expression in Normoxie unabhängig von der Bestrahlung um den Faktor 2 geringer als die der Kontrollen (Abbildung 19).

Weiterhin war die PDK-1 mRNA-Expression in den mit **Hypoxie** inkubierten Proben beider Zelllinien deutlich erhöht. Die A549-Zellen wiesen 3.8-fach (MW: 3.85, KI: 2.65–5.57, $p=0.004$) (Abbildung 18) und die H1299-Zellen 4.7-fache (MW: 4.71, KI: 3.78–5.86; $p<0.001$) (Abbildung 19) erhöhte Werte im Vergleich zu den Kontrollen auf. Auch die unter Hypoxie mit **Photonen** bestrahlten Proben zeigten eine erhöhte PDK-1 mRNA-Expression. In A549-Zellen war sie im Vergleich zu den in Hypoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben 1.8-fach (0 Gy MW: 3.85, KI: 2.65–5.57; 6 Gy MW: 6.91, KI: 5.39–8.86; $p=0.007$) (Abbildung 18) und in H1299-Zellen 1.6-fach (0 Gy MW: 4.71, KI: 3.78–5.86; 6 Gy MW: 7.56, KI: 5.22–9.74; $p=0.006$) (Abbildung 19) erhöht. Nach Hypoxieinkubation und **Kohlenstoffionenbestrahlung** war in beiden Zelllinien kein Unterschied der PDK-1 mRNA-Expression nachweisbar. In den **HIF-1 α inhibierten** der A549-Zellen war die PDK-1 mRNA-Expression nach Hypoxie unabhängig von der Bestrahlungsqualität im Mittel um den Faktor 2 und die der H1299-Zellen um den Faktor 4 geringer als die der Kontrollen (alle $p<0.05$) (Abbildung 18 & Abbildung 19).

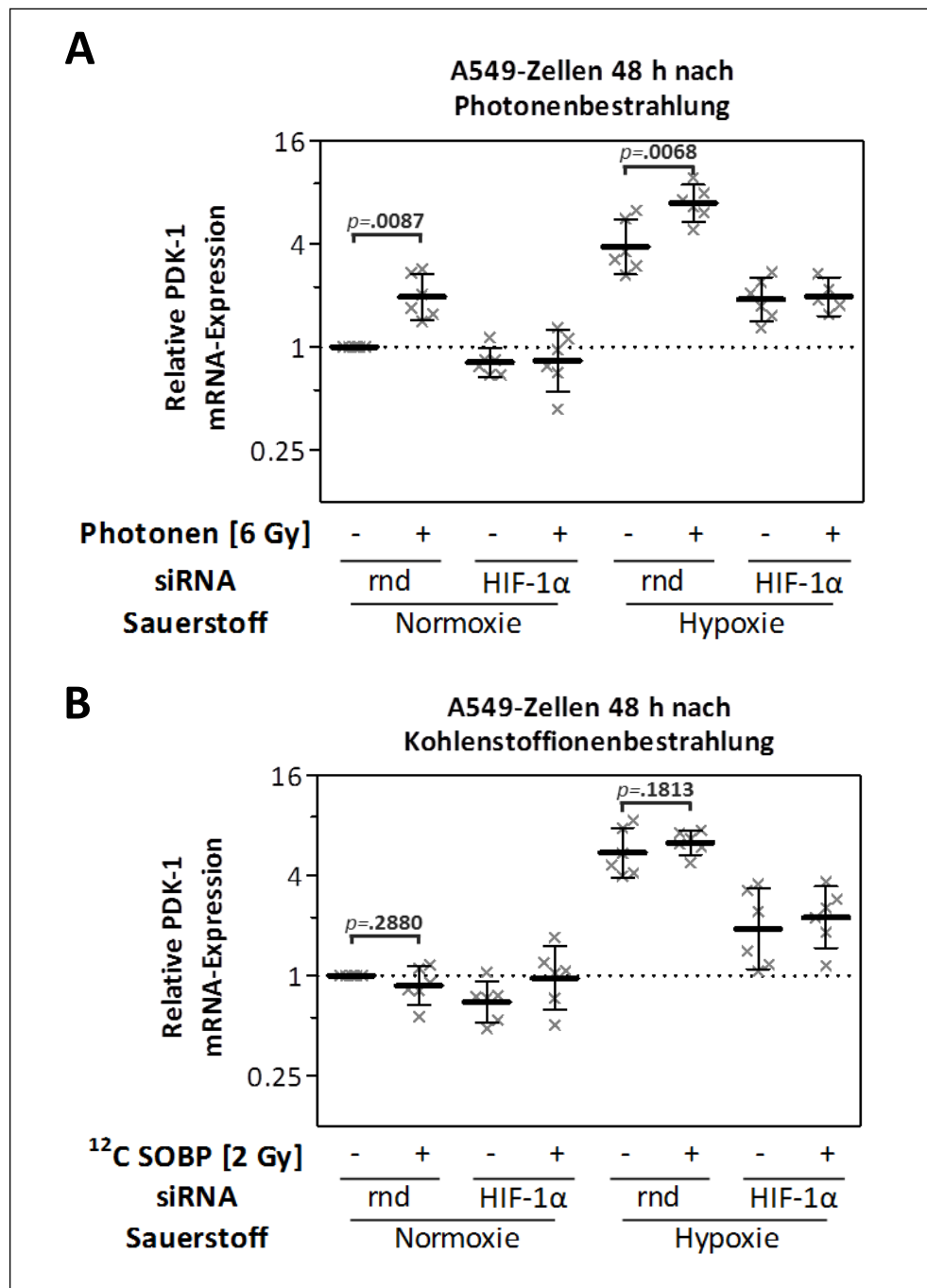


Abbildung 18: Relative PDK-1 mRNA-Expression in A549-Zellen

Die relative PDK-1 mRNA-Expression war 48 h nach Photonenbestrahlung (A), im Gegensatz zur Kohlenstoffionenbestrahlung [^{12}C SOBP] (B), in normoxischen A549-Zellen um das 1.97(1.44...2.67)-fache erhöht. Das Gleiche gilt für die mit Hypoxie inkubierten Zellen, hier ist die PDK-1 mRNA-Expression nach Photonenbestrahlung um das 1.80(1.59...2.03)-fache erhöht, wobei auch diese vermehrte Expression nach Kohlenstoffionenbestrahlung nicht sichtbar wird. Alle Werte wurden zu den in Normoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben in Relation gesetzt ($n \geq 5$). Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte (fettgedruckter Querbalken) und die 95%-Konfidenzintervalle. Ausgewählte Effekte beider Bestrahlungsqualitäten sind zusätzlich mit ihren p -Werten gekennzeichnet.

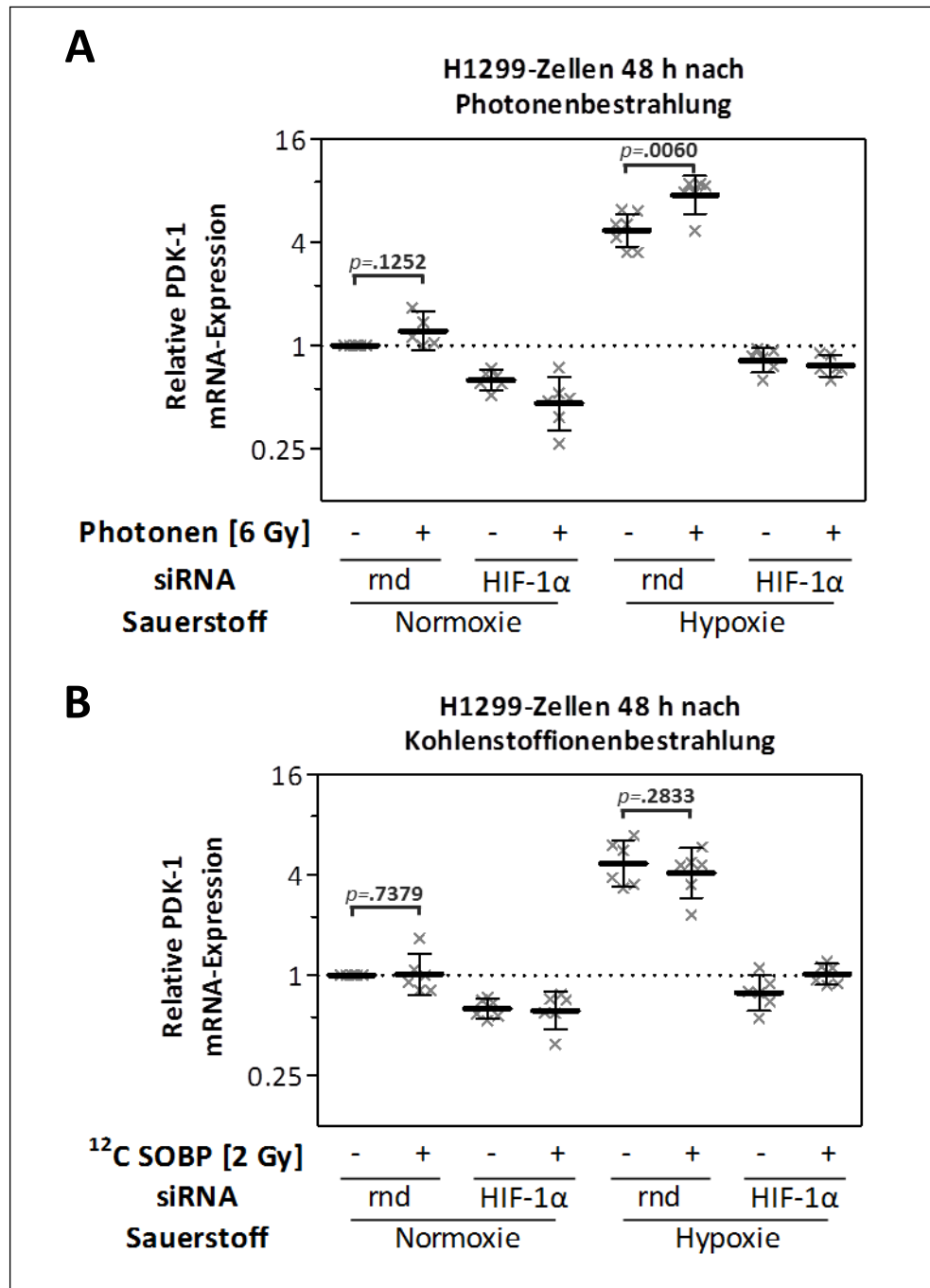


Abbildung 19: Relative PDK-1 mRNA-Expression in H1299-Zellen

Die relative PDK-1 mRNA-Expression war 48 h nach Photonenbestrahlung (A), im Gegensatz zur Kohlenstoffionenbestrahlung [^{12}C SOBP] (B), in normoxischen H1299-Zellen um das 1.21(0.93...1.58)-fache erhöht. Das Gleiche gilt für die mit Hypoxie inkubierten Zellen, hier ist die PDK-1 mRNA-Expression nach Photonenbestrahlung um das 1.61(1.38...1.66)-fache erhöht, wobei auch diese vermehrte Expression nach Kohlenstoffionenbestrahlung nicht sichtbar wird. Alle Werte wurden zu den in Normoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben in Relation gesetzt ($n \geq 5$). Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte (fettgedruckter Querbalken) und die 95%-Konfidenzintervalle. Ausgewählte Effekte beider Bestrahlungsqualitäten sind zusätzlich mit ihren p -Werten gekennzeichnet.

3.3.5. cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (*CDKN1-A* = *p21*)

Als Bestrahlungsmarker wurde Gen p21 untersucht, da es mit zur Regulation des Zellzyklus nach (strahleninduzierten) DNA-Schädigungen beiträgt und so nach Photonen- und Kohlenstoffionenbestrahlung hochreguliert wird.

Sowohl in A549- als auch in H1299-Zellen war die p21 mRNA-Expression durch Bestrahlung unabhängig von der Bestrahlungsqualität erhöht. Im Mittel war die p21 mRNA-Expression der bestrahlten A549-Zellen im Vergleich zu denen der unbestrahlten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und in Normoxie inkubierten Proben um das 4-fache und die der H1299-Zellen um das 2-fache erhöht (alle $p < 0.01$). Hypoxie oder HIF-1 α -Inhibition schienen keinen Einfluss auf die p21 mRNA-Expression zu haben.

3.3.6. Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier untersuchten HIF-1 abhängigen Zielgene in der Regel zum einen in den in Hypoxie inkubierten, jedoch auch in kleinerem Maßstab in den mit Photonen bestrahlten Proben vermehrt exprimiert wurden. Von besonderem Interesse waren deshalb die Mechanismen hinter dieser vermehrten Expression.

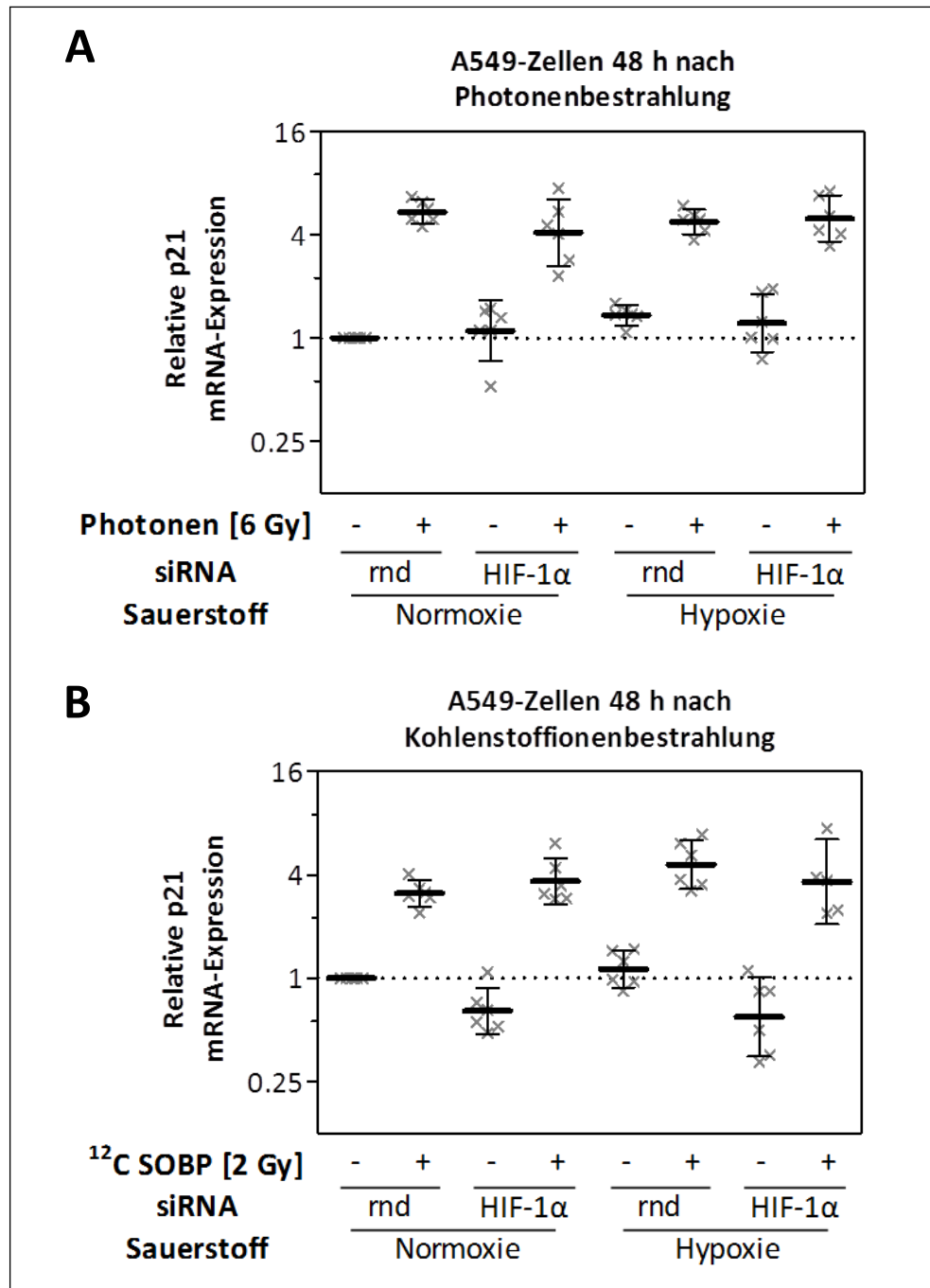


Abbildung 20: Relative p21 mRNA-Expression in A549-Zellen

Die relative p21 mRNA-Expression war sowohl 48 h nach Photonenbestrahlung (A), als auch 48 h nach Kohlenstoffionenbestrahlung [^{12}C SOBP] (B), unabhängig von der sonstigen Behandlung in A549-Zellen im Mittel um das 4-fache erhöht. Alle Werte wurden zu den in Normoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben in Relation gesetzt ($n \geq 5$). Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte (fettgedruckter Querbalken) und die 95%-Konfidenzintervalle.

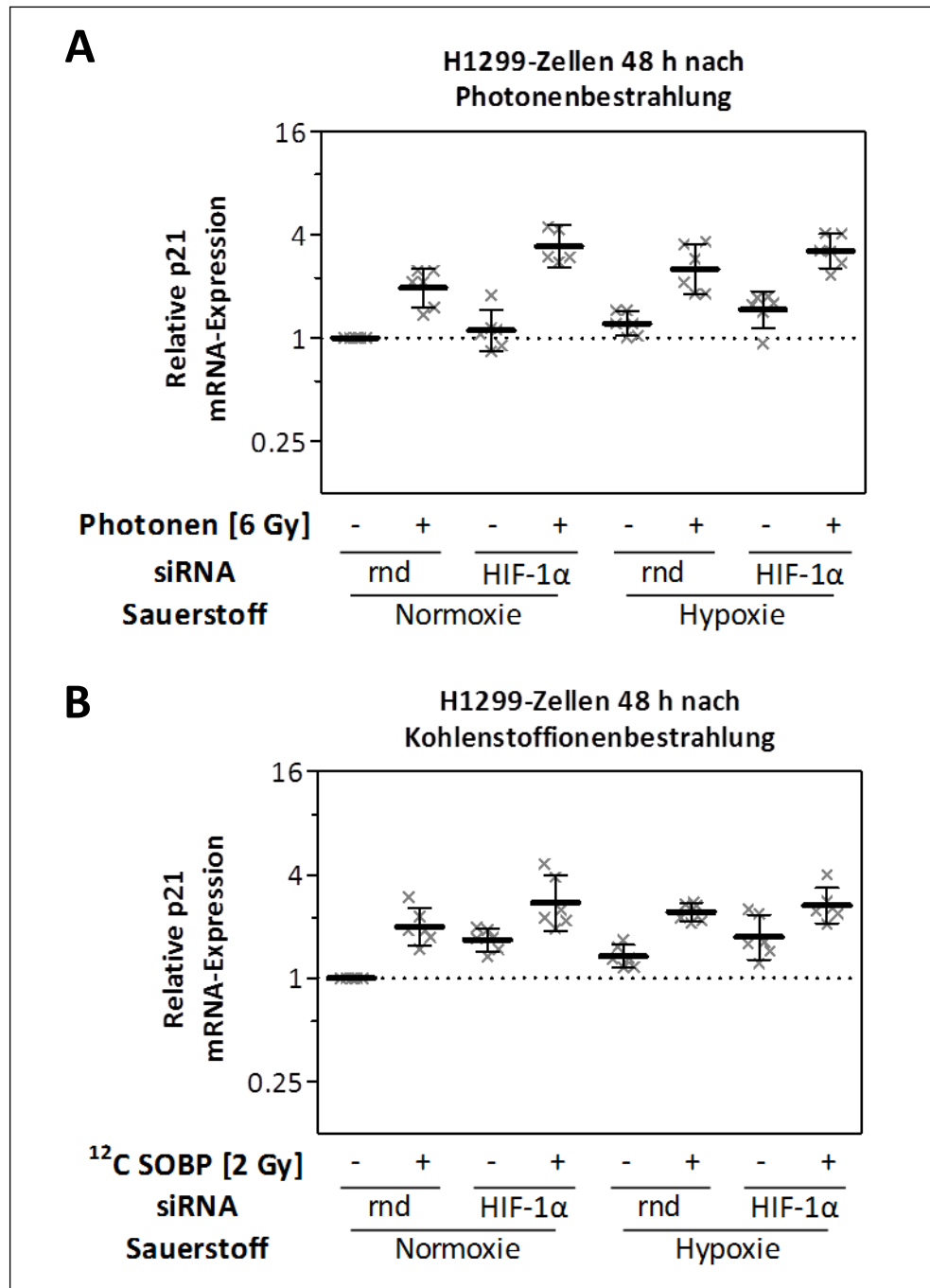


Abbildung 21: Relative p21 mRNA-Expression in H1299-Zellen

Die relative p21 mRNA-Expression war sowohl 48 h nach Photonenbestrahlung (A), als auch 48 h nach Kohlenstoffionenbestrahlung [^{12}C SOBP] (B), unabhängig von der sonstigen Behandlung in H1299-Zellen im Mittel um das 2-fache erhöht. Alle Werte wurden zu den in Normoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben in Relation gesetzt ($n \geq 5$). Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte (fettgedruckter Querbalken) und die 95%-Konfidenzintervalle.

3.4. HIF-1 α abhängige Zielgene (Proteinebene) - VEGF-A

Der folgende Abschnitt zeigt am Beispiel von VEGF-A, wie sich die Proteinexpression der HIF-1 α abhängigen Zielgene durch die, gemäß dem Versuchsprotokoll (s. 2.2.6.) durchgeführten, Behandlungen verändert. Dazu wurden Proben mittels ELISA im Hinblick auf ihre VEGF-A Proteinexpression untersucht. Als Kontrolle dienten die Proben, die in Normoxie inkubiert, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelt und nicht bestrahlt wurden.

Die VEGF-A Proteinexpression war unter **Normoxie** in den mit **Photonen** bestrahlten Proben der A549-Zellen um das 1.5-fache (MW: 1.48, KI: 1.15–1.90, $p=0.022$) (Abbildung 22) und der H1299-Zellen um das 1.6-fache (MW: 1.60, KI: 1.39-1.85, $p=0.001$) (Abbildung 23) höher als die der Kontrollen. Diese vermehrte Expression konnte in den mit **Kohlenstoffionen** bestrahlten Proben nicht beobachtet werden. In den **HIF-1 α inhibierten** Proben war die VEGF-A Proteinexpression beider Zelllinien in Normoxie unabhängig von der Bestrahlung im Mittel um den Faktor 2 geringer als die der Kontrollen (alle $p<0.005$).

Weiterhin war die VEGF-A Proteinexpression in den mit **Hypoxie** inkubierten Proben beider Zelllinien deutlich erhöht. Die A549-Zellen wiesen 1.7-fach (MW: 1.71, KI: 1.45-2.03, $p<0.001$) (Abbildung 22) und die H1299-Zellen 1.6-fach (MW: 1.61, KI: 1.24-2.09, $p=0.007$) (Abbildung 23) erhöhte Werte im Vergleich zu den Kontrollen auf. Auch die unter Hypoxie mit **Photonen** bestrahlten Proben zeigten eine erhöhte VEGF-A Proteinexpression. In A549-Zellen war sie, im Vergleich zu den in Hypoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben, 1.9-fach (0 Gy MW: 1.71, KI: 1.45-2.03; 6 Gy MW: 3.17, KI: 2.59-3.91; $p=0.002$) (Abbildung 22) und in H1299-Zellen 1.8-fach (0 Gy MW: 1.61, KI: 1.24-2.10; 6 Gy MW: 2.88, KI: 2.50–3.30; $p<0.001$) (Abbildung 23) erhöht. Nach Hypoxie und **Kohlenstoffionenbestrahlung** war auch hier in beiden Zelllinien kein Unterschied der HIF-1 α Proteinexpression nachweisbar. In den **HIF-1 α inhibierten** Proben beider Zelllinien war nach Hypoxie die VEGF-A Proteinexpression unabhängig von der Bestrahlung im Mittel um den Faktor 4 geringer als die der in Hypoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) und unbestrahlten Proben (alle $p<0.005$).

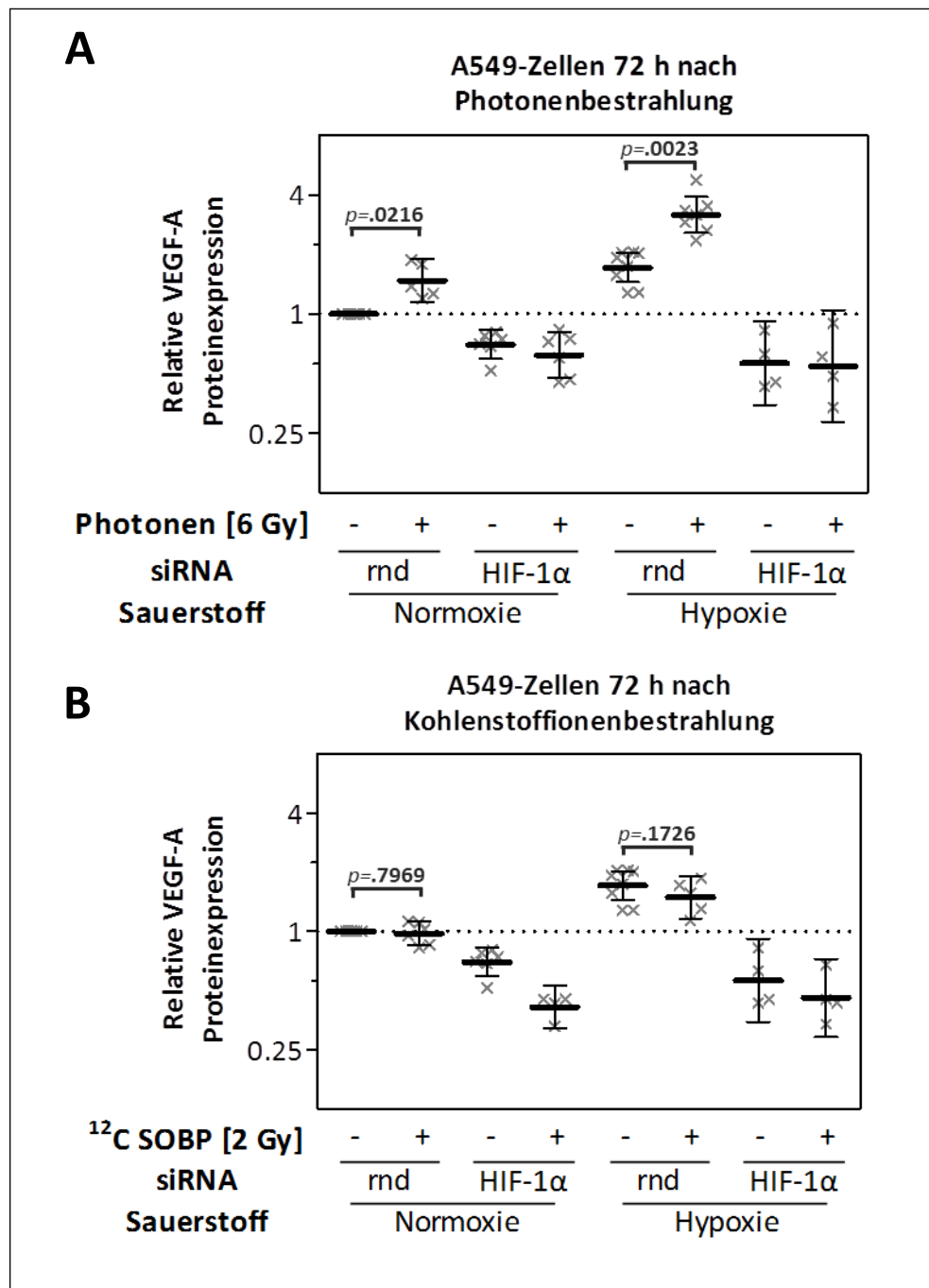


Abbildung 22: Relative VEGF-A Proteinexpression in A549-Zellen

Die relative VEGF-A Proteinexpression war 72 h nach Photonenbestrahlung (A), im Gegensatz zur Kohlenstoffionenbestrahlung [^{12}C SOBP] (B), in normoxischen A549-Zellen um das 1.48(1.15...1.90)-fache erhöht. Das Gleiche gilt für die mit Hypoxie inkubierten Zellen, hier ist die VEGF-A Proteinexpression nach Photonenbestrahlung um das 1.85(1.79...1.93)-fache erhöht, wobei auch diese vermehrte Expression nach Kohlenstoffionenbestrahlung nicht sichtbar wird. Alle Werte wurden zu den in Normoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben in Relation gesetzt ($n \geq 5$). Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte (fettgedruckter Querbalken) und die 95%-Konfidenzintervalle. Ausgewählte Effekte beider Bestrahlungsqualitäten sind zusätzlich mit ihren p -Werten gekennzeichnet.

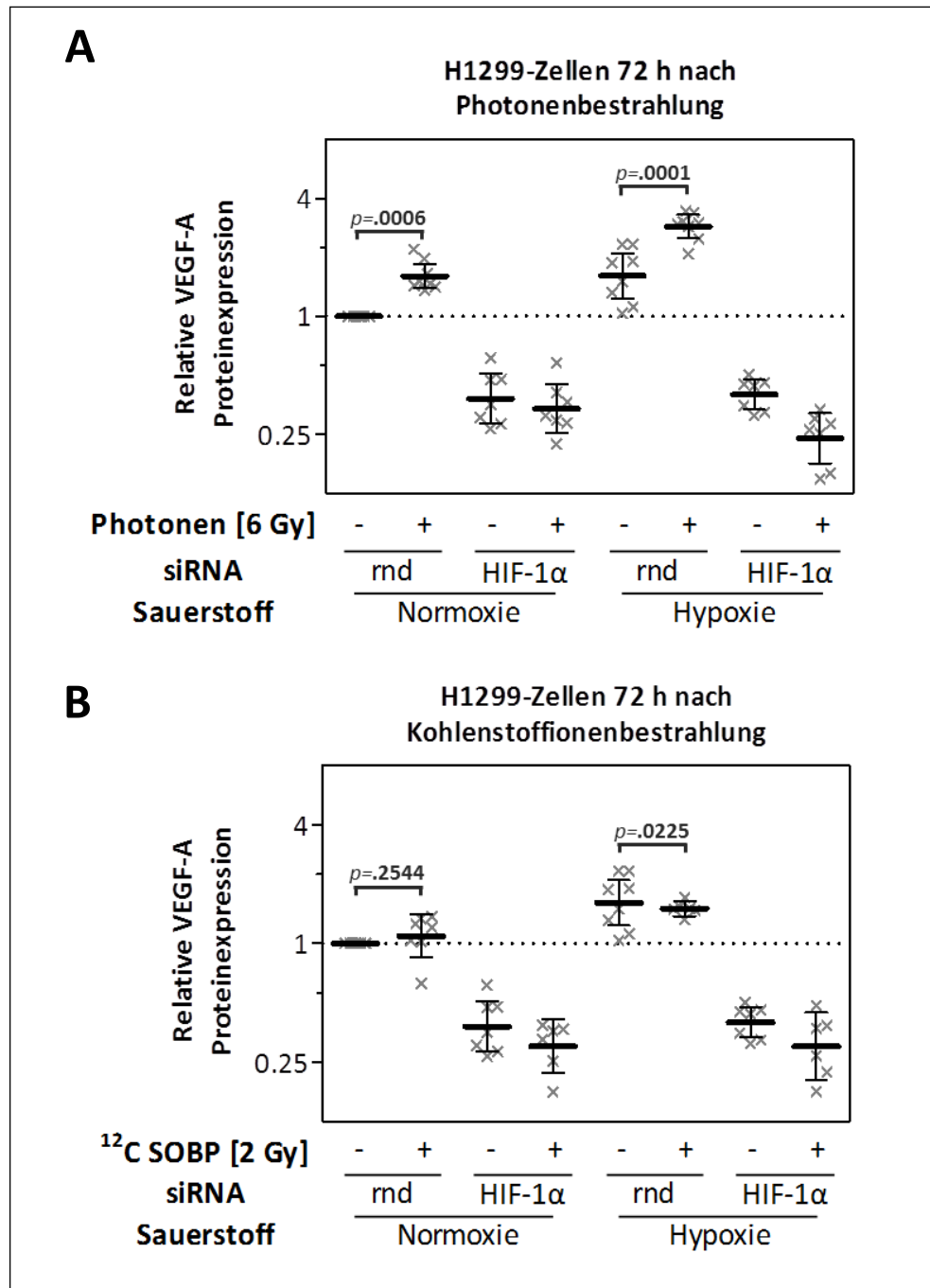


Abbildung 23: Relative VEGF-A Proteinexpression in H1299-Zellen

Die relative VEGF-A Proteinexpression war 72 h nach Photonenbestrahlung (A), im Gegensatz zur Kohlenstoffionenbestrahlung [^{12}C SOBP] (B), in normoxischen H1299-Zellen um das 1.60(1.39...1.85)-fache erhöht. Das Gleiche gilt für die mit Hypoxie inkubierten Zellen, hier ist die VEGF-A Proteinexpression nach Photonenbestrahlung um das 1.79(1.64...2.023)-fache erhöht, wobei auch diese vermehrte Expression nach Kohlenstoffionenbestrahlung nicht sichtbar wird. Alle Werte wurden zu den in Normoxie inkubierten, mit siRNA-Kontrolle (rnd) behandelten und unbestrahlten Proben in Relation gesetzt ($n \geq 5$). Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte (fettgedruckter Querbalken) und die 95%-Konfidenzintervalle. Ausgewählte Effekte beider Bestrahlungsqualitäten sind zusätzlich mit ihren p -Werten gekennzeichnet.

3.5. mTOR-Signalkaskade

Aufgrund der nun wiederholt nachgewiesenen Induktion von HIF-1 α und der davon abhängigen Zielgene durch Photonenbestrahlung und der fehlenden Induktion durch Kohlenstoffionenbestrahlung, war es von besonderer Bedeutung mögliche Ursachen für diesen eventuell wichtigen Vorteil von Kohlenstoffionen zu finden. Die daraus entstandenen Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

3.5.1. DNA-Microarray-Analyse

Zuerst wurde eine DNA-Microarray-Analyse, im Hinblick auf unterschiedliche RNA-Expressionen nach Photonen- im Gegensatz zu Kohlenstoffionenstrahlung, angefertigt. Als besonders interessant stellte sich hierbei die mTOR-Signalkaskade heraus. Diese wird Ausschnittsweise in einer sogenannten Heatmap in Abbildung 24 dargestellt. Rote Kästen deuten hierbei auf eine Expressionszunahme und grüne Kästen auf eine Expressionsabnahme zur jeweiligen Kontrolle hin.

Zu erkennen ist, dass vor allem die Expression des mTOR-Gens FRAP1¹³ und des RPTOR¹⁴-Gens nach Photonenbestrahlung gesteigert waren. Diese Expressionssteigerung fand nach Kohlenstoffionen nicht statt. Insgesamt war jedoch die gesamte PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade, getestet als Genset, nach Photonen- im Vergleich zu Kohlenstoffionenbestrahlung vermehrt aktiviert (1 h: $p=0.0140$; 4 h: $p=0.0086$). Wie sich diese Veränderung der RNA-Ebene auf Proteinebene ausdrückt, wurde danach mit den, in 2.2.6. beschriebenen, Rapamycin Versuchen anhand der Phosphorylierung von mTOR und der gleichzeitigen Bestimmung von HIF-1 α überprüft.

¹³ engl. FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1

¹⁴ engl. Regulatory Associated Protein of mTOR

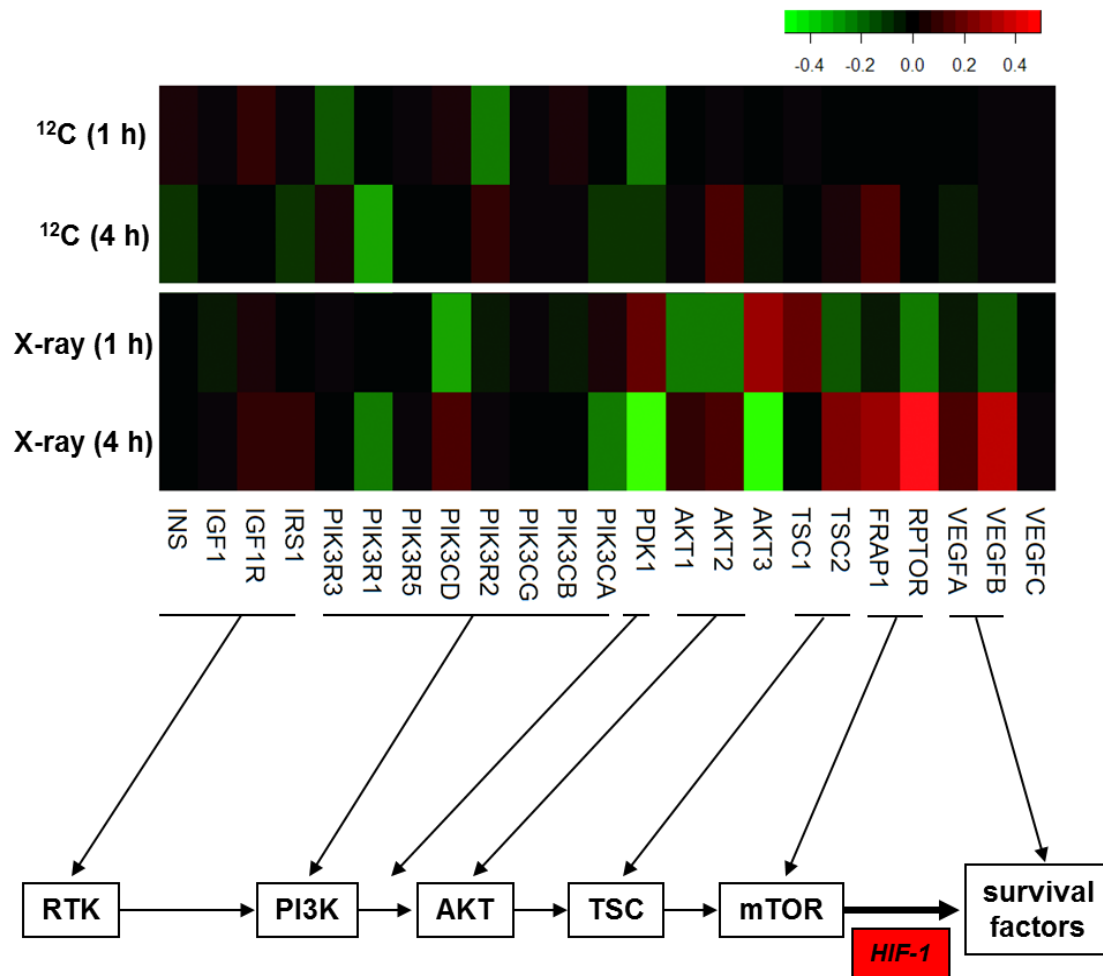


Abbildung 24: Heatmap einer MicroArray Analyse der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade;
 Quelle: Subtil, F. S. B. et al. 2014

3.5.2. Phosphoryliertes mTOR

Dazu wurden Western Blots der Proben aus den Rapamycin-Versuchen für pmTOR (phosphoryliertes mTOR), mTOR und als Ladungskontrolle für β -Actin erstellt und densitometrisch ausgewertet. Die für pmTOR dargestellten Werte wurden erst zur Ladungskontrolle und dann zu den, ebenfalls zu Ladungskontrolle normalisierten, Werten für mTOR normalisiert. Als Kontrolle dienen die unbestrahlten und mit DMSO behandelten Proben des jeweiligen Stoppzeitpunktes.

Es ließ sich erkennen, dass die relative Phosphorylierung von mTOR in den **6 h** nach **Photonenstrahlung** gestoppten Proben der A549-Zellen um das 1.2-fache (MW: 1.18, KI: 1.10–1.27, $p=0.003$) (Abbildung 25A) und der H1299-Zellen um das 1.4-fache (MW: 1.35, KI: 1.18-1.53, $p=0.001$) (Abbildung 25B) höher war als die der Kontrollen. In den mit **Rapamycin** behandelten Proben war die relative Phosphorylierung von mTOR beider Zelllinien im Mittel um den Faktor 2 geringer als die der Kontrollen (alle $p<0.005$).

Weiterhin war zu erkennen, dass die relative Phosphorylierung von mTOR in den mit den **9 h** nach **Photonenstrahlung** gestoppten Proben beider Zelllinien wieder nahezu unverändert zur Kontrolle war. Die im Mittel 2-fach geringere Phosphorylierung von mTOR nach **Rapamycin** Gabe ließen sich jedoch auch zu diesem Zeitpunkt nachweisen (alle $p<0.005$).

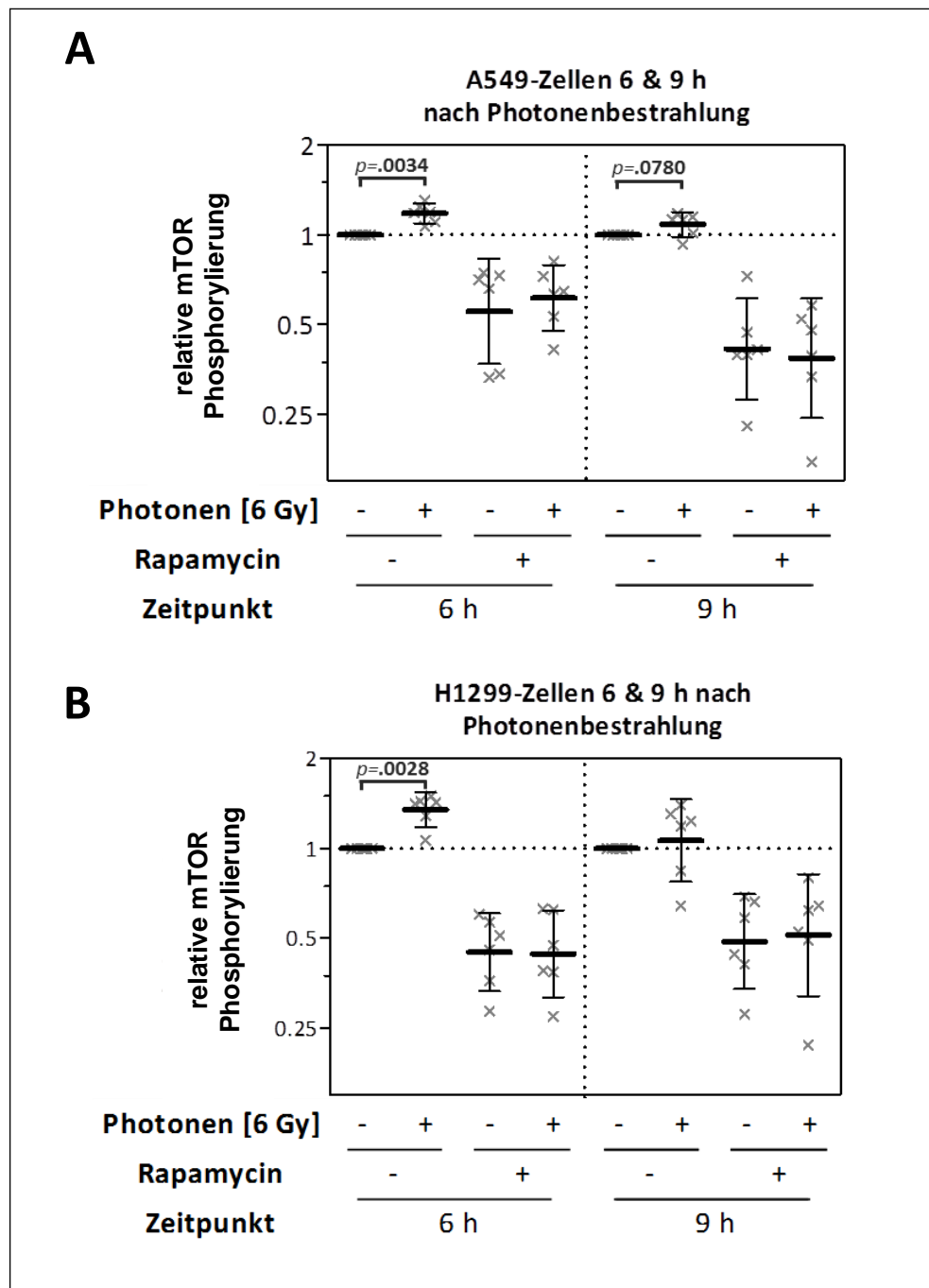


Abbildung 25: relative mTOR Phosphorylierung

Die relative Phosphorylierung von mTOR war 6 h nach Photonenbestrahlung in A549-Zellen (A) um das 1.18(1.10...1.27)-fache und in H1299-Zellen (B) um das 1.35(1.18...1.53)-fache erhöht. Diese vermehrte Phosphorylierung war bereits 9 h nach Photonenbestrahlung nicht mehr sichtbar. Alle Werte wurden zu den unbestrahlten und nicht mit Rapamycin behandelten Proben des gleichen Stoppzeitpunktes in Relation gesetzt ($n \geq 5$). Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte (fettgedruckter Querbalken) und die 95%-Konfidenzintervalle. Ausgewählte Bestrahlungseffekte sind zusätzlich mit ihren p -Werten gekennzeichnet.

3.5.3. HIF-1 α

Um diese erhöhten pmTOR-Werte mit einer erhöhten HIF-1 α Proteinexpression in Verbindung zu bringen, wurden dieselben Proben weiterhin mittels Western Blots auf ihre HIF-1 α -Expression untersucht und densitometrisch ausgewertet. Auch diese relativen HIF-1 α Proteinexpressionen wurden vorher zur Ladungskontrolle (β -Actin) normalisiert.

Es ließ sich erkennen, dass die HIF-1 α Proteinexpression in den **6 h** nach **Photonenstrahlung** gestoppten Proben der A549-Zellen um das 1.1-fache (MW: 1.13, KI: 0.97–1.33, $p=0.10$) (Abbildung 26A) und der H1299-Zellen um das 1.1-fache (MW: 1.10, KI: 0.97-1.25, $p=0.11$) (Abbildung 26B) höher war als die der Kontrollen. In den mit **Rapamycin** behandelten Proben war die HIF-1 α Proteinexpression beider Zelllinien im Mittel um den Faktor 1.7 geringer als die der Kontrollen (alle $p<0.005$).

Weiterhin war zu erkennen, dass dieser Trend in den **9 h** nach **Photonenstrahlung** gestoppten Proben beider Zelllinien deutlicher wurde. Die HIF-1 α Proteinexpression der A549-Zellen war hier um das 1.3-fache (MW: 1.27, KI: 1.15–1.40, $p=0.003$) (Abbildung 26A) und die der H1299-Zellen um das 1.3-fache (MW: 1.27, KI: 1.15-1.40, $p=0.002$) (Abbildung 26B) höher als die der Kontrollen. Die im Mittel 1.7-fach geringeren HIF-1 α Proteinexpressionen nach **Rapamycin** Gabe ließen auch zu diesem Zeitpunkt nachweisen (alle $p<0.005$).

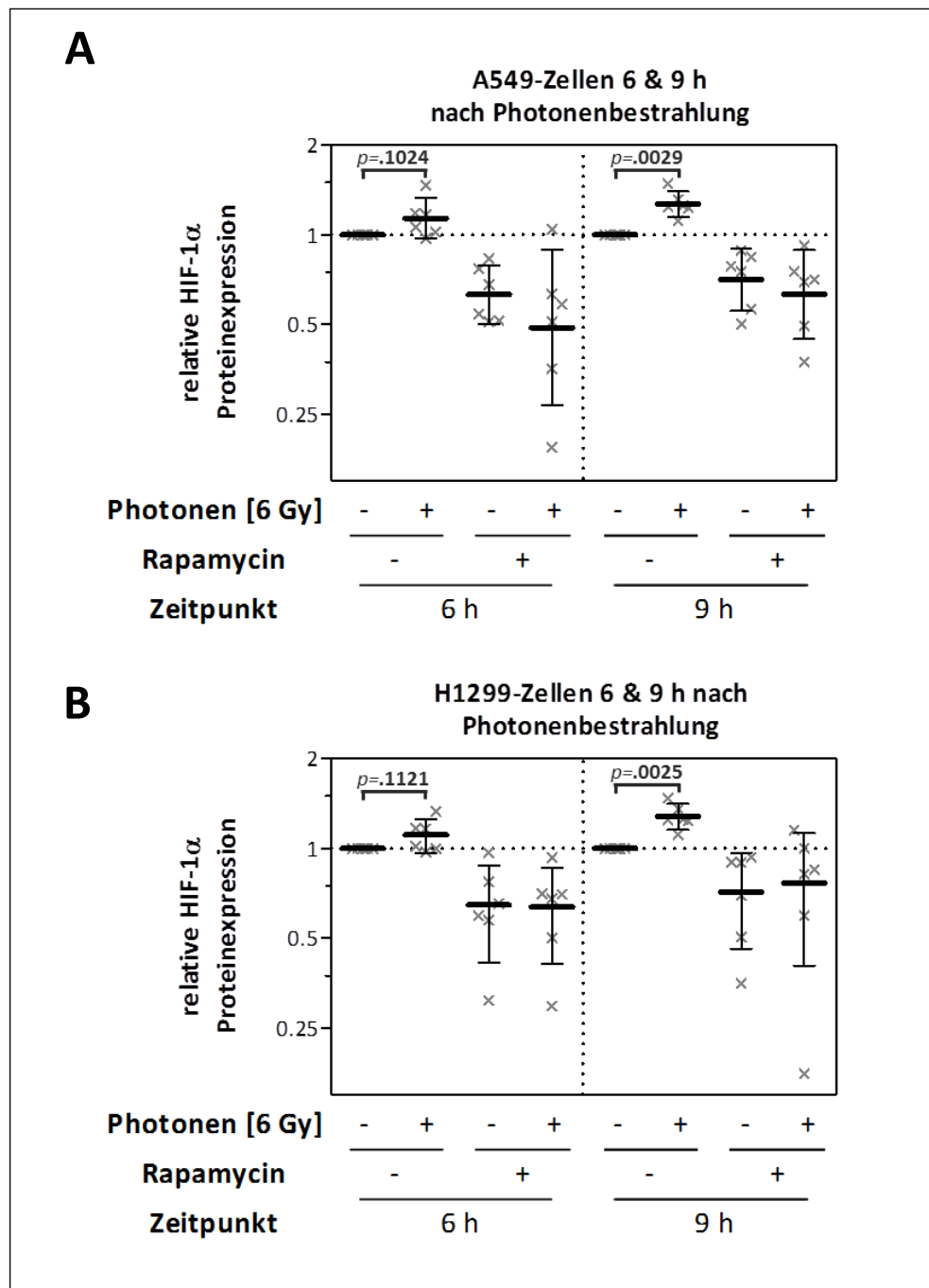


Abbildung 26: Relative HIF-1α Proteinexpression

Die relative HIF-1α Proteinexpression war 9 h nach Photonenbestrahlung sowohl in A549-Zellen (A) als auch in H1299-Zellen (B) um das 1.27(1.15...1.40)-fache erhöht. Diese vermehrte Expression war auch 6 h nach Photonenbestrahlung in schwächerer Form sichtbar. Alle Werte wurden zu den unbestrahlten und nicht mit Rapamycin behandelten Proben des gleichen Stoppzeitpunktes in Relation gesetzt ($n \geq 5$). Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte (fettgedruckter Querbalken) und die 95%-Konfidenzintervalle. Ausgewählte Bestrahlungseffekte sind zusätzlich mit ihren p -Werten gekennzeichnet.

4. Diskussion

4.1. Photonenbestrahlung und HIF-1

HIF-1 wird als Transkriptionsfaktor zahlreicher Gene in gesunden Zellen unter Normoxie sehr schnell abgebaut (Jaakkola et al. 2001). Unter Hypoxie finden diese Abbaumechanismen nicht mehr ausreichend statt und HIF-1 akkumuliert in der Zelle (Wang et al. 1995; Rankin und Giaccia 2008). Diese erhöhte HIF-1 Proteinexpression induziert daraufhin die Expression von zahlreichen HIF-1 abhängigen Zielgenen, welche unter anderem zu einer Anpassung an Sauerstoffmangel führen (Semenza et al. 2003). Deshalb gilt HIF-1 als "master regulator of the hypoxia response" (Dewhirst et al. 2007, S. 249). Die Induktion von HIF-1 durch Hypoxie gilt heute als gesichert (Firth et al. 1994; Wang und Semenza 1993; Semenza und Wang 1992) und wird deshalb an dieser Stelle nicht mehr genauer betrachtet (s. Kapitel 1.3.1.).

In soliden Tumoren herrscht aufgrund des schnellen Wachstums und des gesteigerten Stoffwechsels jedoch sehr häufig ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffverbrauch und –angebot (Vaupel et al. 1989), sodass auch hier häufig erhöhte HIF-1 Expressionen auftreten. Zusätzlich gibt es in vielen Tumoren Mutationen in den Regulationsmechanismen von HIF-1, welche wiederum zu einer erhöhten HIF-1 Expression führen können (z.B. der Funktionsverlust des PTEN-Proteins (Zundel et al. 2000)). Außerdem ist bekannt, dass HIF-1 auch durch Wachstumsfaktoren und damit durch eine Aktivierung verschiedener Signalkaskaden (wie z.B. die PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade) induziert werden kann (Semenza 2002a; Harada et al. 2008; Bussink et al. 2008).

Diese erhöhten HIF-1 Expressionen führen dann zu einer Induktion der Expression zahlreicher HIF-1 abhängiger Gene (Semenza 2003). Dadurch passt sich die Zelle an den Sauerstoffmangel an, entwickelt jedoch auch eine höhere Strahlenresistenz (Ayrapetov et al. 2011; Moeller et al. 2004; Moeller und Dewhirst 2006; Gray et al. 1953). Zu diesem Effekt kommt es über verschiedene Mechanismen, wie z.B. der Hochregulation von VEGF, einer daraus resultierenden Anregung der Angiogenese (Moeller et al. 2004) und dadurch

einer verbesserten Versorgung des Tumors mit Sauerstoff. Die Gesamtzahl dieser Mechanismen sorgt für ein höhere Tumorstadiumsgeschwindigkeit (Ryan et al. 2000) und eine erhöhte Resistenz gegenüber der Photonenstrahlung (Unruh et al. 2003).

Moeller et al. fanden 2004 außerdem heraus, dass auch nach Photonenbestrahlung die HIF-1 Expression gesteigert wird (Moeller et al. 2004). Damit führt Photonenstrahlung selbst paradoxerweise zu einer vermehrten Strahlenresistenz. Die Induktion von HIF-1 durch Photonenbestrahlung konnte in dieser Arbeit sowohl an der HIF-1 α Proteinexpression als auch an der Expression der HIF-1 abhängigen Zielgene gezeigt werden, dies wird im Folgenden näher erläutert.

4.1.1. HIF-1 α Proteinexpression

In den beiden hier untersuchten Zelllinien kam es 48 h nach Photonenbestrahlung unter Normoxie zu einer 1.5-fachen Hochregulation der HIF-1 α Proteinexpression (Abbildung 10 & Abbildung 11). Das bedeutet, dass die Photonenstrahlung selbst zu einer erhöhten Expression von HIF-1 α Protein und damit zu einer erhöhten Strahlenresistenz führt (Kim et al. 2009), sodass die Effekte der darauffolgenden Bestrahlungen abgeschwächt werden. Dies könnte vor allem bei fraktionierten Therapieregimen zu geringeren Therapieeffekten führen. Diesen Mechanismus zu umgehen könnte deshalb einen Vorteil in der Tumorthherapie bedeuten.

Unter hypoxischen Bedingungen war dieser Effekt allenfalls noch als Trend nachweisbar (Abbildung 10 & Abbildung 11). Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass unter Hypoxie die HIF-1 α Proteinexpression ohnehin maximal aktiviert ist und dadurch die Mechanismen, die nach Photonenstrahlung unter Normoxie greifen, keinen großen Effekt mehr haben können. Jedoch wäre eine Methode die HIF-1 α Proteinexpression auch unter hypoxischen Bedingungen zu unterdrücken oder zumindest minimal zu halten, um eine erhöhte Strahlenresistenz zu verhindern, gewiss ein weiterer Fortschritt in der Tumorthherapie (Harada et al. 2007).

4.1.2. Expression der von HIF-1 abhängigen Zielgene

Die eben beschriebene Induktionen von HIF-1 α Protein wirkt sich wiederum auf die von HIF-1 abhängigen Zielgene aus und so konnten auch hier dementsprechende Veränderungen durch Photonenbestrahlung beobachtet werden. So wurde VEGF-A als wichtiger Marker für die Angiogenese auf mRNA-Ebene in A549-Zellen nach Photonenbestrahlung unter *Normoxie* um das 1.7-fache (Abbildung 12) und in H1299-Zellen als Trend um das 1.2-fache (Abbildung 13) hochreguliert. Dieser Effekt war auch unter *Hypoxie* noch sichtbar, dort wurde die VEGF-A mRNA nach Photonenbestrahlung in A549-Zellen um das 2.8-fache (Abbildung 12) und in H1299-Zellen als Trend um das 1.4-fache (Abbildung 13) induziert. Auf der Proteinebene wurde diese Induktion sogar noch deutlicher; Die VEGF-A Proteinexpression wurde durch Photonenbestrahlung unter *Normoxie* in A549-Zellen um das 1.5-fache (Abbildung 12) und in H1299-Zellen um das 1.6-fache (Abbildung 13) hoch reguliert. Auch dieser Effekt war unter *Hypoxie* wieder deutlich sichtbar; Dort wurde die VEGF-A Proteinexpression nach Photonenbestrahlung in A549- und H1299-Zellen um das 1.8-fache (Abbildung 12 & Abbildung 13) induziert.

Damit führt die Photonenbestrahlung sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie zu einer vermehrten Angiogenese, dadurch zu erhöhtem Tumorstadium und schließlich auch wieder zu einer erhöhten Strahlenresistenz. Das Verhindern dieser Induktion ließe sich deshalb therapeutisch nutzbar machen und könnte die Effekte der Photonenbestrahlung verstärken (David H. Gorski et al. 1999; Geng et al. 2001).

Auch GLUT-1, LDH-A und PDK-1 zeigten als Marker für den Tumormetabolismus, welcher durch den Warburg-Effekt vor allem durch anaerobe Glykolyse gekennzeichnet ist (Rademakers et al. 2011; Sonveaux et al. 2008; Schulz et al. 2006), auf mRNA-Ebene ganz ähnliche Induktionsmuster. In A549-Zellen wurde nach Photonenbestrahlung unter *Normoxie* GLUT-1 um das 2.1-fache (Abbildung 14), LDH-A um das 1.4-fache (Abbildung 16) und PDK-1 um das 2.0-fache (Abbildung 18) hoch reguliert. Auch unter *Hypoxie* wurde in A549-Zellen GLUT-1 um das 2.6-fache (Abbildung 14), LDH-A um das 1.4-fache

(Abbildung 16) und PDK-1 um das 1.8-fache (Abbildung 18) nach Photonenbestrahlung hoch reguliert. In H1299-Zellen wurde nach Photonenbestrahlung unter *Normoxie* GLUT-1 als Trend um das 1.3-fache (Abbildung 15), LDH-A um das 1.4-fache (Abbildung 17) und PDK-1 als Trend um das 1.2-fache (Abbildung 19) hoch reguliert. Unter *Hypoxie* war dieser Effekt in H1299-Zellen sogar noch eindeutiger, hier wurde GLUT-1 um das 2.3-fache (Abbildung 15), LDH-A um das 1.7-fache (Abbildung 17) und PDK-1 um das 1.6-fache (Abbildung 19) nach Photonenbestrahlung hoch reguliert.

Damit führt die Photonenbestrahlung sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie zu einer Induktion der anaeroben Glykolyse (Lum et al. 2007), dadurch zu erhöhtem Tumorwachstum und erhöhter Strahlenresistenz (Unruh et al. 2003).

Als letztes Gen wurde p21 untersucht, welches nach Bestrahlung zuverlässig hoch reguliert wurde und damit hervorragend als Bestrahlungsmarker dienen konnte um eine erfolgreiche Bestrahlung zu verifizieren (Abbildung 20 & Abbildung 21). Das galt neben der hier beschriebenen Photonenstrahlung auch für die Kohlenstoffionenstrahlung (auf die später ausführlich eingegangen wird), sodass p21 der optimale Bestrahlungskontrollparameter in diesen Experimenten war (Takahashi et al. 2000; Jakob et al. 2002; Fournier et al. 2004; Jinno-Oue et al. 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die untersuchten HIF-1 abhängigen Zielgene, wie schon bekannt, zum einen durch Hypoxie, jedoch auch durch Photonenbestrahlung hochreguliert wurden und dadurch vermutlich für eine erhöhte Strahlenresistenz sorgen. Ob dies auch im Menschen so stattfinden, kann uns das hier angewandte *in vitro* Modell natürlich nur erahnen lassen, jedoch konnten von unserer Arbeitsgruppe bereits ähnliche Ergebnisse auch *in vivo* gezeigt werden (Fischer und Engenhart-Cabillic 2014). Von besonderem Interesse sind deshalb die Mechanismen hinter dieser Induktion, um Möglichkeiten zu finden, diese zu unterdrücken und dadurch eventuell eine Verbesserung der Therapie zu erreichen.

4.1.3. PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade

Ein aus der Literatur bekannter Grund für diese Induktion nach Photonenbestrahlung hängt mit der Reoxygenierung des Zellverbandes zusammen. Sobald einige Zellen durch die Bestrahlung abgetötet wurden, werden die überlebenden Zellen wieder besser mit Sauerstoff versorgt (Dorie und Kallman 1984). Daraufhin setzen diese sogenannte Stressgranula frei, in denen unter anderem HIF-1 α mRNA gespeichert wurde, sodass vermehrt HIF-1 α Protein transkribiert wird (Moeller et al. 2004). Dieser Effekt trifft jedoch wohl eher auf *in vivo* Modelle zu und spielt in der Zellkultur ohne Vaskularisierung, ohne extrazelluläre Matrix und mit gleichbleibend hohen Sauerstoffkonzentrationen wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle. *In vitro* ist ein Effekt, der 2008 von Harada et al. beschrieben wurde, möglicherweise ausschlaggebender. Dort wurde bewiesen, dass die HIF-1 α Translation nach Photonenbestrahlung durch Phosphorylierungen von AKT und mTOR reguliert wird (Harada et al. 2008; Kim et al. 2009).

Auch diese Ergebnisse konnten hier für beide untersuchten Zelllinien nachvollzogen werden. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von mTOR 6 h nach Photonenbestrahlung in A549-Zellen um das 1.2-fache (Abbildung 25A) und in H1299-Zellen um das 1.4-fache (Abbildung 25B) anstieg. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass auch die HIF-1 α Proteinexpression bereits zu diesem Zeitpunkt anstieg¹⁵; Sie stieg in beiden Zelllinien 6 h nach Photonenbestrahlung um das 1.1-fache (Abbildung 26) und weitere 3 h später, also 9 h nach Photonenbestrahlung, noch eindeutiger auf das 1.3-fache des Ausgangswertes (Kontrolle) an (Abbildung 26).

Dadurch ließ sich erkennen, dass die Aktivierung der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade¹⁶ zu einer zeitlich versetzten Induktion von HIF-1 α führt. Das bedeutet, eine Inhibition dieser Signalkaskade könnte die Induktion von HIF-1 α durch Photonenstrahlen unterdrücken und dadurch zu einer verminderten

¹⁵ Im Gegensatz dazu steigt die HIF-1 α Proteinexpression unter Hypoxie erst nach 24 h deutlich an (Daten nicht gezeigt)

¹⁶ Die Aktivierung der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade wurde hierbei nur beispielhaft anhand der Phosphorylierung von mTOR gezeigt

Strahlenresistenz führen. Um diese These letztlich validieren zu können, bedarf es auch hier jedoch sicherlich eher klinischer Studien oder zumindest eines *in vivo* Modells; Das hier angewandte *in vitro* Modell kann uns in der Hinsicht jedoch Denkanstöße liefern und so an einer möglichen Verbesserung der Therapie mitwirken.

4.2. Inhibition von HIF-1

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Möglichkeiten der Inhibition von HIF-1 untersucht, um die Therapie mit Photonen im Hinblick auf die HIF-1 induzierte Strahlenresistenz zu verbessern.

Zum einen kann die erhöhte HIF-1 Aktivität durch den Abbau von HIF-1 α verhindert werden (Moeller et al. 2005). Dafür wurde in dieser Arbeit vor der Bestrahlung eine spezifisch gegen HIF-1 α gerichtete siRNA transfiziert und so die vorhandene HIF-1 α mRNA abgebaut (s. Abbildung 27). Dieses Vorgehen wurde bereits in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe etabliert (Kamlah et al. 2009).

Weiterhin wurde die Induktion der HIF-1 α Proteinexpression durch Photonenbestrahlung, welche mit einer Aktivierung der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade zusammenhängt (Harada et al. 2008; Bussink et al. 2008), mit einer Hemmung ebenjener Kaskade mittels Rapamycingabe durchgeführt (s. Abbildung 27).

4.2.1. siRNA-Transfektion

Auf HIF-1 α mRNA Ebene wurde deutlich, dass trotz der nur transienten siRNA Transfektion die HIF-1 α mRNA-Expression beider Zelllinien auch 48 h nach der Bestrahlung noch um den Faktor 4 vermindert war (Abbildung 9). Alle weiteren Effekte der Transfektion bauen schließlich darauf auf.

So war auch die HIF-1 α Proteinexpression nach siHIF-1 α Transfektion in beiden Zelllinien und sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie deutlich verringert, im Mittel um den Faktor 4 (Abbildung 10 & Abbildung 11). Dies spiegelte sich wiederum auch in den Expressionen der HIF-1 abhängigen Zielgene

wieder. So wurde VEGF-A als wichtiger Angiogenesefaktor auf mRNA-Ebene durch die siHIF-1 α Transfektion vor allem in den H1299-Zellen zuverlässig unabhängig von der sonstigen Behandlung im Mittel um den Faktor 3 herunterreguliert (Abbildung 13). In A549-Zellen war dieser Effekt hier nicht eindeutig nachweisbar. Auf Proteinebene wurde VEGF-A jedoch wieder in beiden Zelllinien unabhängig von der sonstigen Behandlung herunterreguliert (Abbildung 22 & Abbildung 23). Weiterhin wurde außerdem die mRNA-Expression von Glut-1, LDH-A und PDK-1 analysiert; bei diesen Genen war jedoch nur unter Hypoxie eine Herunterregulation durch siHIF-1 α Transfektion zu erkennen (Abbildung 14 & Abbildung 19). Dies könnte an einer Minimalexpression unter Normoxie liegen.

Insgesamt ließ sich jedoch feststellen, dass die HIF-1 α Inhibition mittels siRNA auf HIF-1 α Proteinebene und teilweise auch auf Zielgenebene sehr effektiv die Expression des jeweiligen Gens inhibierte, so unerwünschte Effekte, wie z.B. eine erhöhte Strahlenresistenz, verhindern und dadurch den therapeutischen Nutzen maximieren könnte (Moeller et al. 2004; Moeller und Dewhirst 2006; Moeller und Dewhirst 2004).

4.2.2. Hemmung der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade

Weiterhin wurde untersucht, ob auch durch Inhibition der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade erhöhte HIF-1 α Expressionen verhindert werden können. Dazu wurde die Phosphorylierung von mTOR mittels Rapamycin verhindert und daraufhin semiquantitativ mittels densitometrischer Auswertung von Western Blots die Phosphorylierung von mTOR (phosphoryliertes mTOR) und HIF-1 α bestimmt.

Als erstes war ersichtlich, dass die Phosphorylierung von mTOR durch Gabe von Rapamycin erfolgreich inhibiert werden konnte. Dies galt für beide Zelllinien und sowohl 6 h als auch 9 h nach Bestrahlung. So sank die Phosphorylierung von mTOR unabhängig von der sonstigen Behandlung nach Rapamycin Gabe im Mittel um den Faktor 2 (Abbildung 25). Diese Inhibition war weiterhin für eine verminderte HIF-1 α Proteinexpression verantwortlich, denn auch diese wurde

durch die Gabe von Rapamycin sowohl 6 h als auch 9 h nach Photonenbestrahlung im Mittel um den Faktor 1.7 herunterreguliert (Abbildung 26).

Insgesamt kann also angenommen werden, dass auch eine Unterdrückung der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade zu einer niedrigen HIF-1 Proteinexpression führt. Vor allem die HIF-1 α Induktion durch Photonenbestrahlung könnte auf diese Weise verhindert werden, was so zu einer gleichbleibend guten Strahlensensibilität führen könnte. Wobei natürlich auch an dieser Stelle wieder gesagt werden muss, dass uns das vorliegende Modell allenfalls Denkanstöße liefern kann und Aussagen zu Therapieerfolgen und –verbesserungen letztlich nur durch klinische Studien gemacht werden können.

4.3. Kohlenstoffionenstrahlung und HIF-1

Ein weiterer vielversprechender Schritt für die Verbesserung der Radiotherapie von Tumoren ist die Bestrahlung mit alternativen Strahlungsarten, so zum Beispiel der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (Nakano et al. 2006; Sugane et al. 2009; Hamada et al. 2010; Grutters et al. 2010; Jiang 2012). Einige herausragende Vorteile dieser Strahlung, wie zum Beispiel der höhere LET, die höhere RBW oder das invertierte Tiefendosisprofil, sind bereits erläutert worden (s. Kapitel 1.2.2.). Weiterhin ist von Interesse, ob diese Kohlenstoffionenstrahlung ähnliche Auswirkungen auf HIF-1 und die davon abhängigen Zielgene wie Photonenbestrahlung hat.

Einen Überblick darüber konnte einer MicroArray-Analyse entnommen werden. Diese zeigte Hinweise dafür, dass Kohlenstoffionen- im Gegensatz zu Photonenstrahlung die PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade nicht induziert und deshalb nicht zu einer Induktion von HIF-1 α führte (Abbildung 24). Ähnliches wurde auch von Ogata et al. bestätigt, die gezeigt haben, dass Kohlenstoffionenstrahlung das metastatische Potential von A549 Zellen durch die Inhibition der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade senkt und dass durch Kohlenstoffionenstrahlung die Phosphorylierung von AKT am Serin 473 dosisabhängig herunterreguliert wird (Ogata et al. 2011). Deshalb lässt sich

vermuten, dass zum einen die Kohlenstoffionen keine Induktion von HIF-1 auslösen (s. Abbildung 27). Zum anderen lässt sich vermuten, dass eine erhöhte HIF-1 Expression weniger Einfluss auf die Behandlung mit Kohlenstoffionen hat.

Zur Überprüfung wurden Proben mit Kohlenstoffionen bestrahlt und wiederum auf mRNA- und Proteinebene auf die Expression von HIF-1 und davonabhängigen Zielgenen hin untersucht.

4.3.1. HIF-1 α Proteinexpression

Für die HIF-1 α Proteinexpression konnte so für beide untersuchten Zelllinien gezeigt werden, dass es durch Kohlenstoffionen- im Gegensatz zur Photonenstrahlung weder unter Normoxie noch unter Hypoxie zu einer Induktion kam (Abbildung 10 & Abbildung 11). Dementsprechend kann der Tumor sich unter Kohlenstoffionenstrahlung schlechter an Bedingungen wie Hypoxie anpassen. Da jedoch HIF-1 nicht als Resistenzfaktor gegen Kohlenstoffionenstrahlung (sondern nur gegen Photonenstrahlung) bekannt ist, kann nicht behauptet werden, dass dies auch hier zu einer erhöhten Strahlensensibilität führt; vielmehr spielt die HIF-1 Expression vermutlich bei der Therapie mit Kohlenstoffionen nur eine untergeordnete Rolle.

4.3.2. Expression der von HIF-1 abhängigen Zielgene

Wie zu erwarten bleibt aufgrund der fehlenden Induktion der HIF-1 α Proteinexpression auch ein Effekt der Kohlenstoffionenstrahlung auf die von HIF-1 abhängigen Zielgene aus. So konnte für beide Zelllinien und alle hier untersuchten Zielgenen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass diese nicht durch Kohlenstoffionenstrahlung induziert wurden (Abbildung 12 - Abbildung 23 jeweils B).

Zusätzlich ließen sich die Expressionen von HIF-1 und den davon abhängigen Zielgenen noch weiter durch siHIF-1 α Transfektion inhibieren (Abbildung 12 - Abbildung 23), ob dies jedoch einen Therapievorteil mit sich bringt ist fraglich. Wahrscheinlicher ist, dass unter Kohlenstoffionenstrahlung die Anpassung und Therapieresistenz des Tumors nur eine untergeordnete Rolle spielt.

4.3.3. PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade

Warum Kohlenstoffionen- im Vergleich zu Photonenstrahlung keine Induktion von HIF-1 bewirkt könnte daran liegen, dass sie keine Rezeptortyrosinkinasen (RTK; z.B. PI3K) phosphoryliert und dadurch auch die PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade nicht aktiviert wird (s. Abbildung 27). Diese Vermutung deckt sich mit den erhobenen MicroArray Daten, die zeigten, dass nur durch Photonen- (nicht jedoch durch Kohlenstoffionenstrahlung) Bestandteile ebenjener Signalkaskade aktiviert wurden (Abbildung 24). Dazu passend wurde außerdem von Ogata et al. 2011 eine Inhibition der Phosphorylierung von AKT nach Kohlenstoffionenstrahlung beschrieben (Ogata et al. 2011). Weiterhin haben Suzuki et al. 2005 herausgefunden, dass eine Inhibition der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade zu einer Inhibition von Anillin (ANLN) und damit zu vermindertem Tumorwachstum führt (Suzuki et al. 2005). Zusätzlich gibt es Anzeichen dafür, dass die PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade nicht nur über die Aktivierung von HIF-1 eine Strahlenresistenz auslöst, sondern weiterhin die Reparaturmechanismen der Tumorzelle aktiviert (Toulany et al. 2012) und die Angiogenese induziert (Takahashi et al. 2003) und auch so zu einer Therapieresistenz führt.

Eine Hemmung dieser Kaskade hätte deshalb eventuell sogar noch weiterreichende Effekte als nur eine gleichbleibend gute Strahlensensibilität.

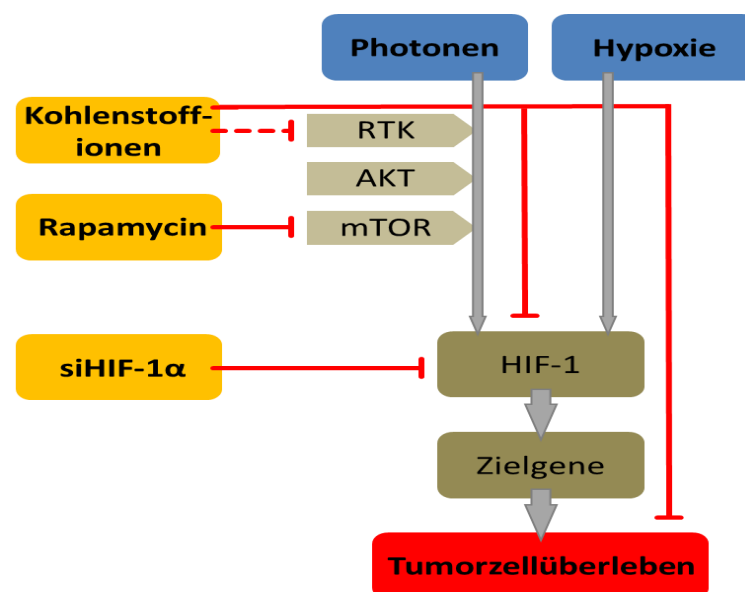


Abbildung 27: Methoden zur Umgehung erhöhter Strahlenresistenz

4.4. Photonen- vs. Kohlenstoffionenstrahlung

Kohlenstoffionenstrahlen haben, wie in der Einleitung (s. Kapitel 1.2.2.) erläutert, biologische und physikalische Vorteile gegenüber den Photonenstrahlen.

Auf physikalischer Seite steht das im Vergleich zu den Photonen invertierte Tiefendosisprofil (Abbildung 2), welches für eine sehr präzise und für das gesunde Gewebe schonende Bestrahlung genutzt werden kann; Wobei jedoch auch größere Tumoren mittels des *Spread-Out-Bragg-Peaks* (SOBP) gut zugänglich sind (Weber und Kraft 2009; Fokas et al. 2009).

Auf der biologischen Seite steht weiterhin der höhere LET, welcher zu sogenannten *clustered DNA damage* (Fokas et al. 2009; Hada und Georgakilas 2008; Dudley T. Goodhead und Goodhead 1999) führt, die nur noch schlecht von den Reparaturmechanismen der Zelle behoben werden können (Heilmann et al. 1996). Außerdem ist die Kohlenstoffionenstrahlung aufgrund des hohen Anteils an direkter Strahlenwirkung weniger auf Sauerstoff angewiesen als Photonenstrahlung. Das bedeutet zum einen, dass die Resistenzfaktoren Hypoxie und erhöhte HIF-1 Expression für die Kohlenstoffionenstrahlung nur eine untergeordnete Rolle spielen (Furusawa et al. 2000). Auf der anderen Seite tritt bei Kohlenstoffionenstrahlung im Gegensatz zu Photonenstrahlung offensichtlich auch keine strahleninduzierte Strahlenresistenz auf, sodass gleichbleibend gute Effekte zu erwarten sind, was vielversprechende klinische Studien bestätigen (Jiang 2012; Miyamoto et al. 2007b; Grutters et al. 2010).

Vereinfacht ausgedrückt sind diese Erkenntnisse in Abbildung 28 (Subtil, F. S. B. et al. 2014) dargestellt. Diese soll zeigen, dass Photonenstrahlen (X-ray) zum einen unter Hypoxie das Tumorzellüberleben nicht suffizient hemmen können. Zum anderen, dass dies zwar unter Normoxie möglich ist, dass jedoch gleichzeitig durch die Phosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) die PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade aktiviert wird. Dadurch werden HIF-1 und die davon abhängigen Zielgene vermehrt exprimiert und so die Strahlenresistenz gesteigert, was in letzter Instanz wiederum zu einem Überleben einzelner Tumorzellen führen kann. Im Gegensatz dazu sind Kohlenstoffionenstrahlen sehr

viel weniger anfällig gegen Hypoxie und lösen keine Signalkaskaden aus, welche zu einer erhöhten Strahlenresistenz führen.

Diese Aussagen gelten sicherlich für die hier durchgeführten Versuche und lassen sich deshalb auf das verwendete *in vitro* Modell anwenden; Ob sich diese Mechanismen jedoch auch in anderen Modellen beziehungsweise im menschlichen Körper in der gleichen Art und Weise abspielen, kann hier nicht geklärt werden. Zum einen gibt es in Tumoren oft eine Vielzahl an Mutationen, die in diese Regulationsmechanismen eingreifen könnten. Zum anderen können in diesem Modell Einflussfaktoren, wie eine extrazelluläre Matrix, Angiogenese oder auch Metabolismus, nur eingeschränkt betrachtet werden. Deshalb bedarf es hier sicherlich weiterer Forschung und vor allem klinischer Studien zur Therapie mit Kohlenstoffionen; Jedoch bietet sich das hier verwendete *in vitro* Modell sicherlich an, um Zusammenhänge aufzuklären und Denkanstöße für weitere Forschung zu liefern.

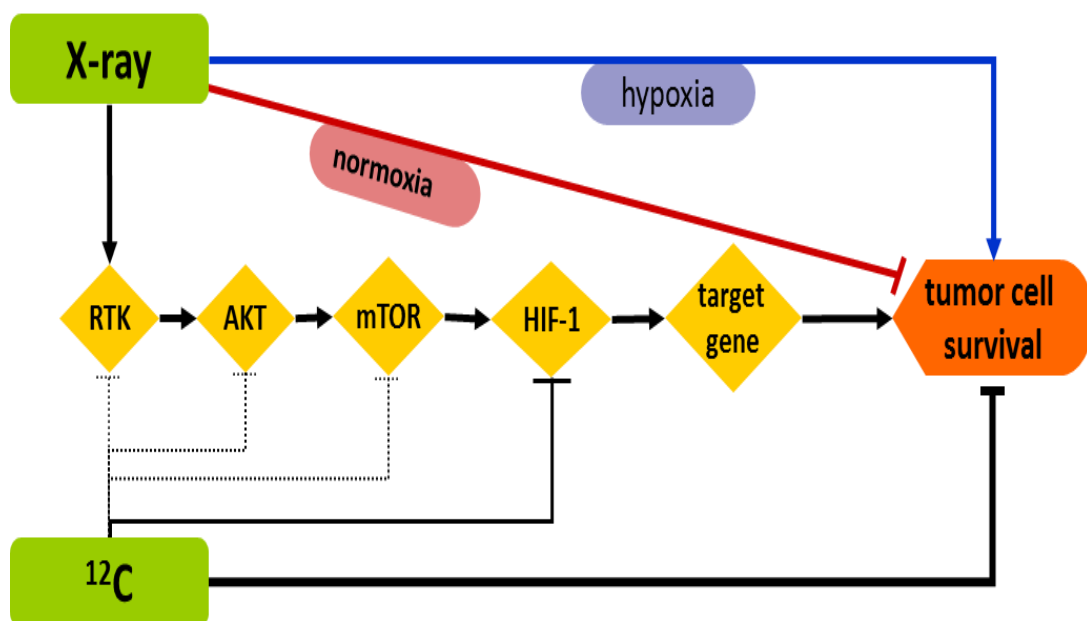


Abbildung 28: Photonen- vs. Kohlenstoffionenstrahlung; schematische Darstellung aus Subtil, F. S. B. et al. 2014

4.5. Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die erhöhte Strahlenresistenz gegenüber Photonenstrahlung bei erhöhten HIF-1 Expressionen, die durch Photonenstrahlung induzierte Strahlenresistenz und vor allem der Vergleich zur Kohlenstoffionenstrahlung genauer untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass HIF-1 und die davon abhängigen Zielgene zum einen durch Hypoxie, aber auch durch Photonenstrahlung, nicht jedoch durch Kohlenstoffionenstrahlung, vermehrt exprimiert wurden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich eine erhöhte HIF-1 Expression nach Photonenbestrahlung durch die Aktivierung der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade erklären ließ. Auf diese Erkenntnisse aufbauend wurden drei Mechanismen angedacht, um diese vermehrte Strahlenresistenz zu verhindern.

Als erstes wurde die vielversprechende und klinisch relevante Kohlenstoffionenstrahlung auf eben jene Resistenzentwicklung untersucht. Diese scheint jedoch für die Kohlenstoffionenstrahlung nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Harada et al. 2012; Dewhirst et al. 2008). Deshalb besteht vor allem hier eine Möglichkeit die heutige Strahlentherapie zu verbessern. Zuvor bedarf es jedoch noch weiterer Grundlagenforschung mit Kohlenstoffionenstrahlung; vor allem die Frage, wie gesundes Gewebe außerhalb des SOBP auf Kohlenstoffionenstrahlung reagiert, ist dabei sicherlich von Interesse.

Weiterhin wurde untersucht, ob sich erhöhte HIF-1 Expressionen auch durch eine Art Medikation verhindern ließen. Dafür wurde zum einen eine Transfektion mit siRNA und zum anderen die Gabe von Rapamycin und damit die Hemmung der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade gewählt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Transfektion zuverlässig eine erhöhte HIF-1 Expression verhinderte und dass die Gabe von Rapamycin in unserem Modell zu einem Ausbleiben der durch Photonen induzierten erhöhten HIF-1 Expression führte. Ob diese beiden Möglichkeiten klinisch praktikabel sein können bleibt abzuwarten. Wobei Rapamycin auch heute schon unter dem Namen „Sirolimus“ eingesetzt wird. Es besteht daher sicherlich noch Forschungsbedarf um diese Mechanismen, wenn möglich, an den menschlichen Körper zu adaptieren.

5. Zusammenfassung

Die Strahlentherapie spielt eine bedeutende Rolle in der Behandlung von Bronchialkarzinomen; Dabei gilt es Resistenzfaktoren zu erkennen und nach Möglichkeit zu umgehen. Für die Bestrahlung mit Photonen ist bekannt, dass Hypoxie zu Therapieversagen führen kann. Dies liegt zum einen an dem sogenannten *chemischen Sauerstoffeffekt* und damit an einer verminderten Radikalbildung. Zum anderem an dem *biologischen Sauerstoffeffekt* und damit an einer vermehrten Expression von HIF-1 und den davon abhängigen Zielgenen. Weiterhin ist bekannt, dass auch die Photonenstrahlung selber zu einer erhöhten HIF-1 Expression und damit zu einer *strahleninduzierten Strahlenresistenz* führt.

In dieser Arbeit wurde modellhaft überprüft, wann es zu einer erhöhten HIF-1 Expression kam, wie sich dies auf die von HIF-1 abhängigen Zielgene auswirkte, was die Mechanismen hinter der vermehrten Expression waren und ob sich eine *strahleninduzierte Strahlenresistenz* verhindern ließ. Dabei wurden drei unterschiedliche Methoden untersucht, um diese *strahleninduzierte Strahlenresistenz* zu umgehen:

1. Abbau der mRNA von HIF-1 α mittels siRNA Transfektion
2. Hemmung der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade
3. Bestrahlung mit Kohlenstoffionen

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass sowohl Hypoxie als auch Photonenstrahlung (nicht jedoch Kohlenstoffionenstrahlung) zu einer erhöhten Expression von HIF-1 und den davon abhängigen Zielgenen führte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dies auf eine Aktivierung der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade zurück zu führen sein könnte. Und letztlich konnte außerdem gezeigt werden, dass alle drei Methoden geeignet waren in unserem *in vitro* System eine vermehrte Expression von HIF-1 und den davon abhängigen Zielgenen zu verhindern und dadurch eine vermehrte Strahlenresistenz zu umgehen.

Bei der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen kam es so zum einen nicht zu einer erhöhten HIF-1 Expression; Zum anderen spielt jedoch HIF-1 bei der Therapie mit Kohlenstoffionen wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle. Die Hemmung der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade mittels Rapamycin verhinderte eine Induktion von HIF-1 nach Photonenbestrahlung und kann dadurch einer *strahleninduzierten Strahlenresistenz* entgegenwirken. Und letztlich ließ sich eine erhöhte HIF-1 Expression, beziehungsweise eine erhöhte Expression der von HIF-1 abhängigen Zielgene und dadurch womöglich auch eine vermehrte Strahlenresistenz zuverlässig durch die Transfektion mit siRNA verhindern.

Um zu entscheiden, ob diese Methoden jedoch am Menschen einsetzbar sind, bedarf es weiterer Forschung. Im Bereich der Kohlenstoffionenstrahlung muss noch viel geforscht werden, bis Patienten regelhaft und mit bestmöglichen Ergebnissen von dieser Therapie profitieren können; Es lässt sich jedoch sagen, dass dies eine vielversprechende Methode bei Therapieversagen unter Photonenstrahlung ist. Auch Rapamycin wird bereits in der Klinik unter anderen Indikationen angewandt und könnte hier möglicherweise zu höheren Therapieerfolgsquoten beitragen. Ob jedoch eine siRNA Transfektion im menschlichen Organismus durchgeführt werden kann, ist unwahrscheinlich, da bei systemischer Anwendung mit weitreichenden Nebenwirkungen zu rechnen ist.

6. Summary

Radiation therapy plays an important role in treatment of lung cancer. Hereby, it is helpful to identify and, if possible, avoid resistance factors. It is known that hypoxia can lead to failure of treatment in radiotherapy with photons. On the one hand, this is due to a so-called *chemical oxygen effect*, which refers to a reduced formation of free radicals. On the other hand, it is caused by the *biological oxygen effect* and thus an increased expression of HIF-1 and HIF-1 dependent genes. Further it is also known that the photon radiation itself leads to increased HIF-1 expression and therefore to *radiation-induced radio resistance*.

In regard to *radiation-induced radioresistance*, this thesis reviewed the situations and underlying mechanisms leading to increased HIF-1 expression and the effect this has on HIF-1 dependent genes. Further, this work was concerned with the means of preventing *radiation-induced radioresistance*; More specifically, it studied the following three methods of avoiding *radiation-induced radioresistance*:

1. Irradiation with carbon ions
2. Inhibition of PI3K / AKT / mTOR signaling cascade
3. Degradation of the mRNA of HIF-1 α by siRNA transfection

In summary it could be shown that both hypoxia as well as irradiation with photons (but not with carbon ions) leads to increased expression of HIF-1 and the HIF-1 dependent genes. Furthermore, it was shown that this could be due to activation of the PI3K / AKT / mTOR signaling cascade. Ultimately, it was also shown that all three methods to bypass an increased radio resistance in our *in vitro* system were suitable to prevent the overexpression of HIF-1 and HIF-1 dependent genes.

On the one hand, cells which were irradiated with carbon ions did not show increased HIF-1 expression. On the other hand HIF-1 however does not play a

major role in treatment with carbon ions. The inhibition of the PI3K / AKT / mTOR signaling pathway with rapamycin prevents induction of HIF-1 by photon irradiation and can circumvent a *radiation-induced radio resistance*. And furthermore transfection with siRNA can reliably prevent high HIF-1 expression and thereby possibly prevent an increased radiation resistance.

To decide whether such methods are suitable for the use on humans, further research is necessary. Especially carbon ion irradiation has yet to be researched until patients can benefit from this in a regular therapy regimen and with the best possible outcome. However, it can be said that this is a promising method to overcome treatment failure in photon radiation. Furthermore the administration of rapamycin is already used in clinical practice under other conditions and could potentially contribute to higher treatment success rates. But it remains unlikely whether siRNA transfection can be performed in the human body.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
°C	Grad Celsius
μ	mikro (10^{-6})
AKT	Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDKN1A (=p21)	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
ct	Schwellenwertzyklus (threshold cycle)
D	Energiedosis
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	Zweifach destilliertes Wasser
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Engl. deoxyribonucleic acid
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	Engl. Fetal Calf Serum
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
Glut-1	Glucose-Transporter-1
Gy	Gray (Dosis)
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser

HIF-1	Hypoxie-induzierbarer-Faktor 1
HRP	engl. Horseradish Peroxidase
LDH-A	Lactat Dehydrogenase A
LET	Linearer Energietransfer
m	Meter oder milli (10^{-3})
M	molar oder Mega (10^6)
min	Minute(n)
mRNA	engl. messenger RNA
mTOR	Engl. mammalian Target of Rapamycin
n	nano (10^{-9})
OD	optische Dichte
P/S	Penicillin/ Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBGD	Porphobilinogendesaminase
PBS	engl. Phosphate Buffered Saline
PDK-1	Pyruvatdehydrogenase-Kinase-1
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RBW (engl. RBE)	Relative biologische Wirksamkeit
RCF	engl. Relative centrifugal force (in g)
rpm	engl. revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
SDS	engl. Sodium Dodecylsulfate
siRNA	engl. Small interfering RNA
Taq	Thermus aquaticus (reverse Transkriptase)

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	engl. Unit (Aktivitätseinheit für Enzyme)
UDG	engl. uracil-DNA glycosylase
u. A.	unter Anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt oder Volumen
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor-A

Außerdem werden die allgemeinen Abkürzungen des SI-Einheiten-Systems verwendet

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialien	- 15 -
Tabelle 2: verwendete PC-Programme	- 16 -
Tabelle 3: Hilfs- & Verbrauchsmittel	- 17 -
Tabelle 4: Lösungen & Kits	- 19 -
Tabelle 5: Gebrauchslösungen	- 20 -
Tabelle 6: siRNA-Sequenzen	- 21 -
Tabelle 7: Antikörper.....	- 21 -
Tabelle 8: Primer	- 22 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klonogener Zelltod; schematische Darstellung	- 2 -
Abbildung 2: Tiefendosisprofil von Photonen und Kohlenstoffionenstrahlung	- 5 -
Abbildung 3: Dosis-Effekt-Kurve.....	- 6 -
Abbildung 4: Aufbau der HIF-Untereinheiten	- 8 -
Abbildung 5: HIF-1 α Regulation.....	- 10 -
Abbildung 6: Mechanismen der HIF-1 Induktion nach Photonenbestrahlung;	- 11 -
Abbildung 7: Zeitlicher Ablauf der HIF-Inhibitionsversuche	- 25 -
Abbildung 8: Zeitlicher Ablauf der Rapamycinversuche	- 26 -
Abbildung 9: Relative HIF-1 α mRNA-Expression nach Transfektion mit siHIF-1 α	- 39 -
Abbildung 10: Relative HIF-1 α Proteinexpression in A549-Zellen	- 42 -
Abbildung 11: Relative HIF-1 α Proteinexpression in H1299-Zellen	- 43 -
Abbildung 12: Relative VEGF-A mRNA-Expression in A549-Zellen.....	- 46 -
Abbildung 13: Relative VEGF-A mRNA-Expression in AH1299-Zellen	- 47 -
Abbildung 14: Relative GLUT-1 mRNA-Expression in A549-Zellen.....	- 49 -
Abbildung 15: Relative GLUT-1 mRNA-Expression in H1299-Zellen	- 50 -
Abbildung 16: Relative LDH-A mRNA-Expression in A549-Zellen.....	- 52 -
Abbildung 17: Relative LDH-A mRNA-Expression in H1299-Zellen	- 53 -
Abbildung 18: Relative PDK-1 mRNA-Expression in A549-Zellen.....	- 55 -
Abbildung 19: Relative PDK-1 mRNA-Expression in H1299-Zellen.....	- 56 -
Abbildung 20: Relative p21 mRNA-Expression in A549-Zellen.....	- 58 -
Abbildung 21: Relative p21 mRNA-Expression in H1299-Zellen	- 59 -
Abbildung 22: Relative VEGF-A Proteinexpression in A549-Zellen	- 61 -
Abbildung 23: Relative VEGF-A Proteinexpression in H1299-Zellen.....	- 62 -
Abbildung 24: Heatmap einer MicroArray Analyse der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade	- 64 -
Abbildung 25: relative mTOR Phosphorylierung.....	- 66 -
Abbildung 26: Relative HIF-1 α Proteinexpression.....	- 68 -
Abbildung 27: Methoden zur Umgehung erhöhter Strahlenresistenz.....	- 78 -
Abbildung 28: Photonen- vs. Kohlenstoffionenstrahlung.....	- 80 -

Literaturverzeichnis

- Aebersold, D. M.; Burri, P.; Beer, K. T.; Laissue, J.; Djonov, V.; Greiner, R. H.; Semenza, G. L. (2001):** Expression of hypoxia-inducible factor-1 α : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. In: *Cancer Res.* 61 (7), S. 2911–2916.
- Ahmedin Jemal, Rebecca Siegel Jiaquan Xu Elizabeth Ward (2010):** Cancer Statistics, 2010. In: *CA Cancer J Clin* (60), S. 277–300
- Anderson, Cynthia S.; Curran, Walter J. (2010):** Combined modality therapy for stage III non-small-cell lung cancer. In: *Semin Radiat Oncol* 20 (3), S. 186–191. DOI: 10.1016/j.semradonc.2010.01.007.
- ATCC: A549.** Online verfügbar unter <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-185.aspx>.
- ATCC: H1299.** Online verfügbar unter <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-5803.aspx>.
- Ayrapetov, Marina K.; Xu, Chang; Sun, Yingli; Zhu, Kaya; Parmar, Kalindi; D'Andrea, Alan D.; Price, Brendan D. (2011):** Activation of Hif1 α by the prolylhydroxylase inhibitor dimethyloxalylglycine decreases radiosensitivity. In: *PLoS ONE* 6 (10), S. e26064. DOI: 10.1371/journal.pone.0026064.
- Bill, Verena Maria; Engenhart-Cabillic, R. (2013):** Expression HIF-1-abhängiger Gene in humanen Lungenadenokarzinom (A549)-Zellen und deren Regulation nach Photonen- und Schwerionenbestrahlung. Marburg, Philipps-Universität Marburg, Diss., 2013. Marburg.
- Brown, J. M.; Giaccia, A. J. (1998):** The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. In: *Cancer Res.* 58 (7), S. 1408–1416. Brown, J. Martin; Wilson, William R. (2004): Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. In: *Nat. Rev. Cancer* 4 (6), S. 437–447. DOI: 10.1038/nrc1367.
- Bruick, R. K.; McKnight, S. L. (2001):** A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. In: *Science* 294 (5545), S. 1337–1340. DOI: 10.1126/science.1066373.
- Bussink, Johan; van der Kogel, Albert J.; Kaanders, Johannes H. A. M. (2008):** Activation of the PI3-K/AKT pathway and implications for radioresistance mechanisms in head and neck cancer. In: *Lancet Oncol.* 9 (3), S. 288–296. DOI: 10.1016/S1470-2045(08)70073-1.
- Cazzalini, Ornella; Scovassi, A. Ivana; Savio, Monica; Stivala, Lucia A.; Prosperi, Ennio (2010):** Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. In: *Mutat. Res.* 704 (1-3), S. 12–20. DOI: 10.1016/j.mrrev.2010.01.009.

- Cheng-Jun Hu; Hu, Cheng-Jun; Wang, Li-Yi; Chodosh, Lewis A.; Keith, Brian; Simon, M. Celeste (2003):** Differential Roles of Hypoxia-inducible Factor 1 alpha and HIF-2alpha in Hypoxic Gene regulation // Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. In: *Molecular and Cellular Biology* 23 (24), S. 9361–9374. DOI: 10.1128/MCB.23.24.9361-9374.2003.
- Choi, N.; Baumann, M.; Flentjie, M.; Kellokumpu-Lehtinen, P.; Senan, S.; Zamboglou, N.; Kosmidis, P. (2001):** Predictive factors in radiotherapy for non-small cell lung cancer: present status. In: *Lung Cancer* 31 (1), S. 43–56.
- David H. Gorski, Michael H. Beckett Nora T. Jaskowiak et al; Gorski, D. H.; Beckett, M. A.; Jaskowiak, N. T.; Calvin, D. P.; Mauceri, H. J. et al. (1999):** Blockade of the Vascular Endothelial Growth Factor Stress Response Increases the Antitumor Effects of Ionizing Radiation // Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. In: *Cancer Research* 59 (59 // 14), S. 3374–3378
- Delaney, Geoff; Jacob, Susannah; Featherstone, Carolyn; Barton, Michael (2005):** The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. In: *Cancer* 104 (6), S. 1129–1137. DOI: 10.1002/cncr.21324.
- Dellas, Kathrin; Bache, Matthias; Pigorsch, Steffi U.; Taubert, Helge; Kappler, Matthias; Holzapfel, Daniel et al. (2008):** Prognostic impact of HIF-1alpha expression in patients with definitive radiotherapy for cervical cancer. In: *Strahlenther Onkol* 184 (3), S. 169–174. DOI: 10.1007/s00066-008-1764-z.
- Dewhirst, Mark W.; Cao, Yiting; Li, Chuan Yuan; Moeller, Benjamin (2007):** Exploring the role of HIF-1 in early angiogenesis and response to radiotherapy. In: *Radiother Oncol* 83 (3), S. 249–255. DOI: 10.1016/j.radonc.2007.05.016.
- Dewhirst, Mark W.; Cao, Yiting; Moeller, Benjamin (2008):** Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. In: *Nat. Rev. Cancer* 8 (6), S. 425–437. DOI: 10.1038/nrc2397.
- Dorie, M. J.; Kallman, R. F. (1984):** Reoxygenation in the RIF-1 tumor. In: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 10 (5), S. 687–693.
- Dorit Shweiki, Ahuva Itin Dov Soffer & Eli Keshet; Shweiki, D.; Itin, A.; Soffer, D.; Keshet, E. (1992):** Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. In: *Nature* 1992 // 359 (359 // 6398), S. 843–845. DOI: 10.1038/359843a0.
- Dudley T. Goodhead; Goodhead, D. T. (1999):** Nuclear Instruments and Methods in Physics Research // Mechanisms for the biological effectiveness of high-LET radiations. In: *J. Radiat. Res.* 40 (40), S. 1–13. Fandrey, Joachim (2007): Regulation der Sauerstoffhomöostase durch Hypoxie-induzierbaren Faktor-1. In: *BIOspektrum* 13, S. 26–28.

Firth, J. D.; Ebert, B. L.; Pugh, C. W.; Ratcliffe, P. J. (1994): Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (14), S. 6496–6500.

Fischer, Julia; Engenhart-Cabillic, R. (2014): Photonenstrahlung vs. Kohlenstoffionenstrahlung: Der Einfluss der Strahlenqualität auf das Tumormikromilieu von A549 Tumoren in Abhängigkeit von HIF-1. Marburg, Philipps-Universität Marburg, Diss., 2014. Marburg.

Fokas, Emmanouil; Kraft, Gerhard; An, Hanxiang; Engenhart-Cabillic, Rita (2009): Ion beam radiobiology and cancer: time to update ourselves. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1796 (2), S. 216–229. DOI: 10.1016/j.bbcan.2009.07.005.

Fournier, C.; Wiese, C.; Taucher-Scholz, G. (2004): Accumulation of the cell cycle regulators TP53 and CDKN1A (p21) in human fibroblasts after exposure to low- and high-LET radiation. In: *Radiat. Res.* 161 (6), S. 675–684.

Furusawa, Y.; Fukutsu, K.; Aoki, M.; Itsukaichi, H.; Eguchi-Kasai, K.; Ohara, H. et al. (2000): Inactivation of aerobic and hypoxic cells from three different cell lines by accelerated (3)He-, (12)C- and (20)Ne-ion beams. In: *Radiat. Res.* 154 (5), S. 485–496.

G. Kraft (2000): Tumorthrapy with ion beams. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*

Geng, L.; Donnelly, E.; McMahon, G.; Lin, P. C.; Sierra-Rivera, E.; Oshinka, H.; Hallahan, D. E. (2001): Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy. In: *Cancer Res.* 61 (6), S. 2413–2419

Goeckenjan, G.; Sitter, H.; Thomas, M.; Branscheid, D.; Flentje, M.; Griesinger, F. et al. (2010): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. In: *Pneumologie* 64 Suppl 2 (S 02), S. e1-164. DOI: 10.1055/s-0029-1243837.

Gray, L. H.; Conger, A. D.; Ebert, M.; Hornsey, S.; Scott, O. C. (1953): The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. In: *Br J Radiol* 26 (312), S. 638–648.

Grutters, Janneke P. C.; Kessels, Alfons G. H.; Pijls-Johannesma, Madelon; Ruysscher, Dirk de; Joore, Manuela A.; Lambin, Philippe (2010): Comparison of the effectiveness of radiotherapy with photons, protons and carbon-ions for non-small cell lung cancer: a meta-analysis. In: *Radiother Oncol* 95 (1), S. 32–40. DOI: 10.1016/j.radonc.2009.08.003.

Hada, Megumi; Georgakilas, Alexandros G. (2008): Formation of Clustered DNA Damage after High-LET Irradiation: A Review. In: *JRR* 49 (3), S. 203–210. DOI: 10.1269/jrr.07123.

- Hamada, Nobuyuki; Iimaoka, Tatsuhiko; Masunada, Shin-ichiro; Ogata, Toshiyuki; Oakayasu, Ryuichi; Takahashi, Akihisa et al. (2010):** Recent Advances in the Biology of Heavy-Ion Cancer Therapy. In: *JRR* 51 (4), S. 365–383. DOI: 10.1269/jrr.09137.
- Hammerschmidt, Stefan; Wirtz, Hubert (2009):** Lung cancer: current diagnosis and treatment. In: *Dtsch Arztebl Int* 106 (49), S. 809–18; quiz 819–20. DOI: 10.3238/arztebl.2009.0809.
- Hänze, Jörg; Eul, Bastian G.; Savai, Rajkumar; Krick, Stefanie; Goyal, Parag; Grimminger, Friedrich et al. (2003):** RNA interference for HIF-1 α inhibits its downstream signalling and affects cellular proliferation. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312 (3), S. 571–577. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.10.153.
- Harada, H.; Itasaka, S.; Kizaka-Kondoh, S.; Shibuya, K.; Morinibu, A.; Shinomiya, K.; Hiraoka, M. (2008):** The Akt/mTOR Pathway Assures the Synthesis of HIF-1 Protein in a Glucose- and Reoxygenation-dependent Manner in Irradiated Tumors. In: *Journal of Biological Chemistry* 284 (8), S. 5332–5342. DOI: 10.1074/jbc.M806653200.
- Harada, H.; Kizaka-Kondoh, S.; Li, G.; Itasaka, S.; Shibuya, K.; Inoue, M.; Hiraoka, M. (2007):** Significance of HIF-1-active cells in angiogenesis and radioresistance. In: *Oncogene* 26 (54), S. 7508–7516. DOI: 10.1038/sj.onc.1210556.
- Harada, Hiroshi; Inoue, Masahiro; Itasaka, Satoshi; Hirota, Kiichi; Morinibu, Akiyo; Shinomiya, Kazumi et al. (2012):** Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels. In: *Nat Commun* 3, S. 783. DOI: 10.1038/ncomms1786.
- Hedi M. Sowter, Raju Raval John Moore et al (2003):** Predominant Role of Hypoxia-Inducible Transcription Factor (HIF)-1 α versus HIF-2 α in Regulation of the Transcriptional Response to Hypoxia. In: *Cancer Research*.
- Heilmann, J.; Taucher-Scholz, G.; Haberer, T.; Scholz, M.; Kraft, G. (1996):** Measurement of intracellular dna double-strand break induction and rejoining along the track of carbon and neon particle beams in water. In: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 34 (3), S. 599–608.
- Herrmann, Thomas; Baumann, Michael; Dörr, Wolfgang (2006):** Klinische Strahlenbiologie. Kurz und bündig. 4. Aufl. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer.
- Höckel, M.; Vaupel, P. (2001):** Biological consequences of tumor hypoxia. In: *Semin. Oncol.* 28 (2 Suppl 8), S. 36–41.
- Ivan, M.; Kondo, K.; Yang, H.; Kim, W.; Valiando, J.; Ohh, M. et al. (2001):** HIF α Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing. In: *Science* 292 (5516), S. 464–468. DOI: 10.1126/science.1059817.

Jaakkola, P.; Mole, D. R.; Tian, Y. M.; Wilson, M. I.; Gielbert, J.; Gaskell, S. J. et al. (2001): Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. In: *Science* 292 (5516), S. 468–472. DOI: 10.1126/science.1059796.

Jakob, B.; Scholz, M.; Taucher-Scholz, G. (2000): Immediate localized CDKN1A (p21) radiation response after damage produced by heavy-ion tracks. In: *Radiat. Res.* 154 (4), S. 398–405.

Jakob, B.; Scholz, M.; Taucher-Scholz, G. (2002): Characterization of CDKN1A (p21) binding to sites of heavy-ion-induced damage: colocalization with proteins involved in DNA repair. In: *Int. J. Radiat. Biol.* 78 (2), S. 75–88. DOI: 10.1080/09553000110090007.

Jiang, Guo-Liang (2012): Particle therapy for cancers: a new weapon in radiation therapy. In: *Front Med* 6 (2), S. 165–172. DOI: 10.1007/s11684-012-0196-4.

Jinno-Oue, Atsushi; Shimizu, Nobuaki; Hamada, Nobuyuki; Wada, Seiichi; Tanaka, Atsushi; Shinagawa, Masahiko et al. (2010): Irradiation with carbon ion beams induces apoptosis, autophagy, and cellular senescence in a human glioma-derived cell line. In: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 76 (1), S. 229–241. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2009.08.054.

Kamlah, F.; Eul, B. G.; Li, S.; Lang, N.; Marsh, L. M.; Seeger, W. et al. (2009): Intravenous injection of siRNA directed against hypoxia-inducible factors prolongs survival in a Lewis lung carcinoma cancer model. In: *Cancer Gene Ther.* 16 (3), S. 195–205. DOI: 10.1038/cgt.2008.71.

Kamlah, Florentine; Hänze, Jörg; Arenz, Andrea; Seay, Ulrike; Hasan, Diya; Juricko, Janko et al. (2011): Comparison of the Effects of Carbon Ion and Photon Irradiation on the Angiogenic Response in Human Lung Adenocarcinoma Cells. In: *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* 80 (5), S. 1541–1549. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2011.03.033.

Kedersha, N. L.; Gupta, M.; Li, W.; Miller, I.; Anderson, P. (1999): RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 α to the assembly of mammalian stress granules. In: *J. Cell Biol.* 147 (7), S. 1431–1442.

Kim, Woo-Young; Oh, Seung Hyun; Woo, Jong-Kyu; Hong, Waun Ki; Lee, Ho-Young (2009): Targeting heat shock protein 90 overrides the resistance of lung cancer cells by blocking radiation-induced stabilization of hypoxia-inducible factor-1 α . In: *Cancer Res.* 69 (4), S. 1624–1632. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0505.

Koukourakis, Michael I.; Giatromanolaki, Alexandra; Sivridis, Efthimios; Simopoulos, Constantinos; Turley, Helen; Talks, Kate et al. (2002): Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. In: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 53 (5), S. 1192–1202.

Laubenberger, Theodor; Laubenberger, Jörg (1999): Technik der medizinischen Radiologie. Diagnostik, Strahlentherapie, Strahlenschutz ; für Ärzte, Medizinstudenten und MTRA ; [mit 71 Tabellen]. 7. Aufl. Köln: Dt. Ärzte-Verl.

- Li, Fang; Sonveaux, Pierre; Rabbani, Zahid N.; Liu, Shanling; Yan, Bin; Huang, Qian et al. (2007):** Regulation of HIF-1 α stability through S-nitrosylation. In: *Mol. Cell* 26 (1), S. 63–74. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.02.024.
- Lum, Julian J.; Bui, Thi; Gruber, Michaela; Gordan, John D.; DeBerardinis, Ralph J.; Covello, Kelly L. et al. (2007):** The transcription factor HIF-1 α plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. In: *Genes Dev.* 21 (9), S. 1037–1049. DOI: 10.1101/gad.1529107.
- M. Bamberg, M. Molls H. Sack (Hg.):** Radioonkologie Band 1 Grundlagen (2005)
- Mahon, P. C.; Hirota, K.; Semenza, G. L. (2001):** FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. In: *Genes Dev.* 15 (20), S. 2675–2686. DOI: 10.1101/gad.924501.
- Makino, Y.; Cao, R.; Svensson, K.; Bertilsson, G.; Asman, M.; Tanaka, H. et al. (2001):** Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. In: *Nature* 414 (6863), S. 550–554. DOI: 10.1038/35107085.
- Manalo, Dominador J.; Rowan, Ashley; Lavoie, Tera; Natarajan, Lakshmi; Kelly, Brian D.; Ye, Shui Q. et al. (2005):** Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. In: *Blood* 105 (2), S. 659–669. DOI: 10.1182/blood-2004-07-2958.
- Maxwell, P. H.; Wiesener, M. S.; Chang, G. W.; Clifford, S. C.; Vaux, E. C.; Cockman, M. E. et al. (1999):** The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. In: *Nature* 399 (6733), S. 271–275. DOI: 10.1038/20459.
- Miyamoto, Tadaaki; Baba, Masayuki; Sugane, Toshio; Nakajima, Mio; Yashiro, Tomoyasu; Kagei, Kennji et al. (2007a):** Carbon ion radiotherapy for stage I non-small cell lung cancer using a regimen of four fractions during 1 week. In: *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2 (10), S. 916–926. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181560a68.
- Miyamoto, Tadaaki; Baba, Masayuki; Yamamoto, Naoyoshi; Koto, Masashi; Sugawara, Toshiyuki; Yashiro, Tomoyasu et al. (2007b):** Curative treatment of Stage I non-small-cell lung cancer with carbon ion beams using a hypofractionated regimen. In: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 67 (3), S. 750–758. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2006.10.006.
- Moeller, B. J.; Dewhirst, M. W. (2006):** HIF-1 and tumour radiosensitivity. In: *Br. J. Cancer* 95 (1), S. 1–5. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603201.
- Moeller, Benjamin J.; Cao, Yiting; Li, Chuan Y.; Dewhirst, Mark W. (2004):** Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. In: *Cancer Cell* 5 (5), S. 429–441
- Moeller, Benjamin J.; Dewhirst, Mark W. (2004):** Raising the bar: how HIF-1 helps determine tumor radiosensitivity. In: *Cell Cycle* 3 (9), S. 1107–1110.

Moeller, Benjamin J.; Dreher, Matthew R.; Rabbani, Zahid N.; Schroeder, Thies; Cao, Yiting; Li, Chuan Y.; Dewhirst, Mark W. (2005): Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. In: *Cancer Cell* 8 (2), S. 99–110. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.06.016.

Nakano, Takashi; Suzuki, Yoshiyuki; Ohno, Tatsuya; Kato, Shingo; Suzuki, Michiya; Morita, Shinroku et al. (2006): Carbon beam therapy overcomes the radiation resistance of uterine cervical cancer originating from hypoxia. In: *Clin. Cancer Res.* 12 (7 Pt 1), S. 2185–2190. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1907.

Ogata, Toshiyuki; TESHIMA, Teruki; Inaoka, Miho; MINAMI, Kazumasa; TSUCHIYA, Takahiro; ISONO, Masaru et al. (2011): Carbon ion irradiation suppresses metastatic potential of human non-small cell lung cancer A549 cells through the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling pathway. In: *J. Radiat. Res.* 52 (3), S. 374–379. DOI: 10.1269/jrr.10102.

Pass, Harvey I. (2010): Principles and practice of lung cancer. The official reference text of the IASLC. 4. Aufl. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

Rademakers, Saskia E.; Lok, Jasper; van der Kogel, Albert J.; Bussink, Johan; Kaanders, Johannes H. A. M. (2011): Metabolic markers in relation to hypoxia; staining patterns and colocalization of pimonidazole, HIF-1 α , CAIX, LDH-5, GLUT-1, MCT1 and MCT4. In: *BMC Cancer* 11 (1), S. 167. DOI: 10.1186/1471-2407-11-167.

Rankin, E. B.; Giaccia, A. J. (2008): The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. In: *Cell Death Differ.* 15 (4), S. 678–685. DOI: 10.1038/cdd.2008.21.

Roots, R.; Okada, S. (1975): Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells. In: *Radiation research* 64 (2), S. 306–320.

Ryan, H. E.; Poloni, M.; McNulty, W.; Elson, D.; GASSMANN, M.; Arbeit, J. M.; Johnson, R. S. (2000): Hypoxia-inducible factor-1 α is a positive factor in solid tumor growth. In: *Cancer Res.* 60 (15), S. 4010–4015.

Schulz, Tim J.; Thierbach, René; Voigt, Anja; Drewes, Gunnar; Mietzner, Brun; Steinberg, Pablo et al. (2006): Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. In: *J. Biol. Chem.* 281 (2), S. 977–981. DOI: 10.1074/jbc.M511064200.

Seegenschmiedt, M. H.; Zehe, M.; Fehlauer, F.; Barzen, G. (2012): Möglichkeiten und Perspektiven des Qualitätsmanagements in der Radioonkologie. In: *Der Urologe. Ausg. A* 51 (11), S. 1546–1557. DOI: 10.1007/s00120-012-3021-4.

Semenza, G. L. (2001): Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease. In: *Pediatr. Res.* 49 (5), S. 614–617. DOI: 10.1203/00006450-200105000-00002.

- Semenza, G. L.; Wang, G. L. (1992):** A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. In: *Mol. Cell. Biol.* 12 (12), S. 5447–5454.
- Semenza, Gregg (2002a):** Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. In: *Biochem. Pharmacol.* 64 (5-6), S. 993–998
- Semenza, Gregg L. (2002b):** HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. In: *Trends Mol Med* 8 (4 Suppl), S. S62-7.
- Semenza, Gregg L. (2003):** Targeting HIF-1 for cancer therapy. In: *Nat. Rev. Cancer* 3 (10), S. 721–732. DOI: 10.1038/nrc1187.
- Semenza, Gregg L.; Prabhakar, Nanduri R.; Lahiri, Sukhamay (2003):** Oxygen sensing. Responses and adaptation to hypoxia. New York: Marcel Dekker (Lung biology in health and disease, 175).
- Sonveaux, Pierre; Végran, Frédérique; Schroeder, Thies; Wergin, Melanie C.; Verrax, Julien; Rabbani, Zahid N. et al. (2008):** Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. In: *J. Clin. Invest.* 118 (12), S. 3930–3942. DOI: 10.1172/JCI36843.
- Staab, Adrian; Fleischer, Markus; Loeffler, Juergen; Said, Harun M.; Katzer, Astrid; Plathow, Christian et al. (2011):** Small interfering RNA targeting HIF-1 α reduces hypoxia-dependent transcription and radiosensitizes hypoxic HT 1080 human fibrosarcoma cells in vitro. In: *Strahlenther Onkol* 187 (4), S. 252–259. DOI: 10.1007/s00066-011-2167-0.
- Subtil, F. S. B.; Wilhelm, J.; Bill, V.; Westholt, N.; Rudolph, S.; Fischer, J. et al. (2014):** Carbon ion radiotherapy of human lung cancer attenuates HIF-1 signaling and acts with considerably enhanced therapeutic efficiency. In: *The FASEB Journal* 28 (3), S. 1412–1421. DOI: 10.1096/fj.13-242230.
- Sugane, Toshio; Baba, Masayuki; Imai, Reiko; Nakajima, Mio; Yamamoto, Naoyoshi; Miyamoto, Tadaaki et al. (2009):** Carbon ion radiotherapy for elderly patients 80 years and older with stage I non-small cell lung cancer. In: *Lung Cancer* 64 (1), S. 45–50. DOI: 10.1016/j.lungcan.2008.07.007.
- Sugden, Mary C.; Holness, Mark J. (2003):** Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. In: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284 (5), S. E855-62. DOI: 10.1152/ajpendo.00526.2002.
- Suzuki, Chie; Daigo, Yataro; Ishikawa, Nobuhisa; Kato, Tatsuya; Hayama, Satoshi; Ito, Tomoo et al. (2005):** ANLN plays a critical role in human lung carcinogenesis through the activation of RHOA and by involvement in the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. In: *Cancer Res.* 65 (24), S. 11314–11325. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1507.
- Takahashi, A.; Ohnishi, K.; Tsuji, K.; Matsumoto, H.; Aoki, H.; Wang, X. et al. (2000):** WAF1 accumulation by carbon-ion beam and alpha-particle irradiation in human glioblastoma cultured cells. In: *Int. J. Radiat. Biol.* 76 (3), S. 335–341.

- Takahashi, Satoru (2011):** Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. In: *Biol. Pharm. Bull.* 34 (12), S. 1785–1788
- Takahashi, Yutaka; TESHIMA, Teruki; Kawaguchi, Naomasa; Hamada, Yoshinosuke; Mori, Seiji; Madachi, Ayako et al. (2003):** Heavy ion irradiation inhibits in vitro angiogenesis even at sublethal dose. In: *Cancer Res.* 63 (14), S. 4253–4257
- Toulany, Mahmoud; Lee, Kyung-Jong; Fattah, Kazi R.; Lin, Yu-Fen; Fehrenbacher, Brigit; Schaller, Martin et al. (2012):** Akt promotes post-irradiation survival of human tumor cells through initiation, progression, and termination of DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. In: *Mol. Cancer Res.* 10 (7), S. 945–957. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0592.
- Unruh, Annika; Ressel, Anke; Mohamed, Hamid G.; Johnson, Randall S.; Nadrowitz, Roger; Richter, Eckart et al. (2003):** The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. In: *Oncogene* 22 (21), S. 3213–3220. DOI: 10.1038/sj.onc.1206385.
- Vaupel, P.; Kallinowski, F.; Okunieff, P. (1989):** Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. In: *Cancer Res.* 49 (23), S. 6449–6465
- W. Mueller-Klieser (2010):** Das Tumormikromilieu. In: *Nuklearmedizin* 49
- Wang, G. L.; Jiang, B. H.; Rue, E. A.; Semenza, G. L. (1995):** Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (12), S. 5510–5514
- Wang, G. L.; Semenza, G. L. (1993):** General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (9), S. 4304–4308
- Weber, Uli; Kraft, Gerhard (2009):** Comparison of carbon ions versus protons. In: *Cancer J* 15 (4), S. 325–332. DOI: 10.1097/PPO.0b013e3181b01935.
- Wenger, Roland H.; Stiehl, Daniel P.; Camenisch, Gieri (2005):** Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. In: *Sci. STKE* 2005 (306), S. re12. DOI: 10.1126/stke.3062005re12.
- Wenzl, Tatiana; Wilkens, Jan J. (2011):** Theoretical analysis of the dose dependence of the oxygen enhancement ratio and its relevance for clinical applications. In: *Radiat Oncol* 6 (1), S. 171. DOI: 10.1186/1748-717X-6-171.
- Weyrather, W. K.; Kraft, G. (2004):** RBE of carbon ions: experimental data and the strategy of RBE calculation for treatment planning. In: *Radiother Oncol* 73 Suppl 2, S. S161-9.

Xueguan, Lu; Xiaoshen, Wang; Yongsheng, Zhang; Chaosu, Hu; Chunying, Shen; Yan, Feng (2008): Hypoxia inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor expression are associated with a poor prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma receiving radiotherapy with carbogen and nicotinamide. In: *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 20 (8), S. 606–612. DOI: 10.1016/j.clon.2008.07.001.

Zentrum für Krebsregisterdaten: Krebs in Deutschland 2007/2008

Zundel, W.; Schindler, C.; Haas-Kogan, D.; Koong, A.; Kaper, F.; Chen, E. et al. (2000): Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. In: *Genes Dev.* 14 (4), S. 391–396.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen / Herren:

In Marburg:

Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic

In Gießen:

PD Dr. Ahlemeyer

Dr. I. Askevold

Prof. Dr. Baumgart-Vogt

Dr. Bödeker

Prof. Dr. T. Chakraborty

Prof. Dr. Dr. R. Dettmeyer

Prof. Dr. Dreyer

Prof. Dr. T. Eikmann

Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic

Prof. Dr. B. Gallhofer

Prof. Dr. S. Giffhorn-Katz

Prof. Dr. M. Goebler

PD Dr. R. Hörbelt

Prof. Dr. M. Kaps

Dr. T. Karg

Prof. Dr. J.P. Klußmann

Prof. Dr. M. Kracht

Prof. Dr. J. Kreuder

Prof. Dr. J. Kruse

Prof. Dr. U. Lange

Prof. Dr. B. Lorenz

Prof. Dr. Meinhardt

Prof. Dr. U. Müller

Prof. Dr. Niepmann

Dr. Oehmke

Prof. Dr. W. Padberg

Prof. Dr. Preissner

Prof. Dr. W.S. Rau

Dr. Repp

Prof. Dr. M. Rickert

Prof. Dr. V. Roelcke

Prof. Dr. J. Schneider

Prof. Dr. Schnettler

Prof. Dr. R. Schäffer

Prof. Dr. W. Seeger

Prof. Dr. Skrandies

Prof. Dr. Dr. H.-R. Tinneberg

Prof. Dr. Teschemacher

Prof. Dr. Kummer

Dr. Dr. Valerius

Prof. Dr. W. Weidner

Danksagung

Zunächst danke ich Frau Professor Dr. Rita Engenhardt-Cabillic, die mit der Bereitstellung des Themas, durch Anregungen, kritische Beurteilungen und Korrekturen das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht hat.

Weiterhin geht ein besonderer Dank an meine Betreuerin Frau Dr. Florentine Subtil, ohne deren tatkräftige Unterstützung, Ideen und andauernde Motivation diese Arbeit wohl kaum zu einem guten Ende gefunden hätte.

Für die freundliche Arbeitsatmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft möchte ich den restlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Florentine Subtil und vor allem Florian Leinberger danken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Schließlich bleibt noch meiner Familie, meinen Freunden und meiner Frau zu danken, ohne die ich nicht die Möglichkeit gehabt hätte mich mit dieser Arbeit zu befassen und ohne die ich oftmals kaum die Motivation gefunden hätte um weiter zu machen.

Ich danke allen für ihre Motivation, Aufmunterung, Kritik und Unterstützung, die mir das Studium und das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben.